DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

β-ciklodextrinek celluláris hatásainak vizsgálata Dr. Rusznyák Ágnes Témavezető: Dr. Fenyvesi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1 A ciklodextrinek	8
3.2 Az NF- kappa B útvonal	14
3.3 Autofágia	16
3.4 siRNS	19
4. Célkitűzés	22
5. Anyagok és módszerek	23
5.1 Felhasznált anyagok	23
5.2 Sejttenyésztés	23
5.3 Fluoreszcens mikroszkópia	24
5.4 Áramlási citometria	24
5.5 Ciklodextrinek celluláris hatásainak vizsgálata	24
5.5.1 Citotoxicitás vizsgálat RTCA módszerrel	24
5.5.2 Ciklodextrinek celluláris internalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával	24
5.5.3 Ciklodextrinek celluláris internalizációjának vizsgálata áramlási citometriával	25
5.5.4 NF-kappa B útvonal vizsgálata	25
5.5.5 Autofágia vizsgálata	26
5.5.5.1 Kvalitatív vizsgálat	26
5.5.5.2 Kvantitatív vizsgálat	26
5.5.6 Lizoszómák vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával	27
5.5.7 Lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával	27
5.6 Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképességének vizsgálata	27

5.6.1 Polyplexek előállítása	27
5.6.2 A polyplexek tulajdonságainak vizsgálata DLS technológiával	
5.6.3 A polyplexek tulajdonságainak vizsgálata gélelektroforézissel	
5.6.4 Sejtproliferáció vizsgálata RTCA módszerrel	
5.6.5 siRNS fluoreszcens jelölése	29
5.6.6 Polyplexek celluláris internalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával	29
5.6.7 Polyplexek celluláris internalizációjának vizsgálata áramlási citometriával	30
5.7 Statisztikai analízis	
6. Eredmények	31
6.1 Ciklodextrinek celluláris hatásai	31
6.1.1 Citotoxicitás	31
6.1.2 Celluláris internalizáció	32
6.1.3 NF-kappaB útvonalra gyakorolt hatás	
6.1.4 Autofágiára gyakorolt hatás	
6.1.5 A lizoszómák eljutnak a sejtekbe	40
6.2 Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképessége	43
6.2.1 Az előállított polyplexek tulajdonságai	43
6.2.2 Polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatása	47
6.2.3 Polyplexek celluláris internalizációja	49
7. Megbeszélés	54
7.1 Celluláris hatás vizsgálatok eredményeinek megbeszélése	54
7.2 siRNS hordozó képesség vizsgálat eredményeinek megbeszélése	59
8. Összefoglalás	61
9. Conclusion	62
10. Irodalomjegyzék	63
10.1 Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	63

10.2 A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke	72
11. Ábrajegyzék	75
12. Táblázatjegyzék	76
13. Tárgyszavak	77
14. Keywords	77
15. Köszönetnyilvánítás	78

1. Rövidítések

NHBCDPS	epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony mono-amino-
	béta-ciklodextrin polimer
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC-HPBCD	fluoreszcein-izotiocianát molekulával jelölt hidroxi- propil-béta-ciklodextrin
FITC-QABCDP	fluoreszcein izotiocianát molekulával jelölt epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony kvaterner- amino-béta-ciklodextrin-polimer
FITC-RAMEB	fluoreszcein-izotiocianát molekulával jelölt random metilezett béta-ciklodextrin
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfatáz-dehidrogenáz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPBCD	2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin
NF-ĸB	nuclear factor-kappa B
PEI	polietilén-imin
PDI	Polidiszperzitás index
PBS	Phosphate Buffered Saline
Рдр	P-glikoprotein
QABCDP	epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony kvaterner- amino-béta-ciklodextrin-polimer
RAMEB	random metilezett béta-ciklodextrin
Rho-HPBCD	rhodaminnal jelölt hidroxi-propil-béta-ciklodextrin
Rho-RAMEB	rhodaminnal jelölt random metilezett béta-ciklodextrin
siRNS	short interfering (rövid interferáló) ribonukleinsav

TNF-α	tumor nekrózis faktor-α

2. Bevezetés

A napjainkban alkalmazott vagy újonnan szintetizált hatóanyagok nagy többsége a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (Biopharmaceutical Classification System, BCS) alapján a IV. csoportba sorolható. Ez azt jelenti, hogy az adott anyagnak mind a permeabilitása, mind pedig az oldékonysága rossz. Az oldékonyság, ezáltal a hatóanyag biológiai hasznosíthatóságának növelése érdekében számos segédanyagra van szükség. Ilyen segédanyagok például a ciklodextrinek.

A ciklodextrinek alkalmazása, és ezen segédanyagokkal kapcsolatos kutatások száma évről-évre növekszik, amit mi sem bizonyít jobban, mint, hogy évente több, mint 1000 publikáció jelenik meg ebben a témakörben az elmúlt 15 évben a Pubmed adatbázis alapján.

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok. Különböző iparágak, mint például a gyógyszer-, élelmiszer-, kozmetikai-, diagnosztikum-, robbanószer- és a műanyagipar is különféle módon használja fel ezen segédanyagokat [1]. A ciklodextrineket főként a gyógyszer- és élelmiszeriparban alkalmazzák oldékonyság növelésre, a biológiai hasznosíthatóság növelésére, stabilizálásra, valamint a kellemetlen ízek elfedésére és az irritáló hatások csökkentésére [2].

Több, jelenleg is forgalomban lévő készítményben találkozhatunk ciklodextrinekkel. Ilyen például az Abilify injekció, amely szulfobutilált-bétaciklodextrint (SBECD), vagy a Voltaren Ophta CD szemcsepp, amely hidroxi-propilgamma-ciklodextrint tartalmaz. Mindemelett a ciklodextreineket antidótumként is alkalmazzák: a Bridion nevű készítmény, amely Sugammadexet tartalmaz a rokurónium vagy a vekurónium izomrelaxáns hatását képes felfüggeszteni [3]. Az élelmiszeripar is egyre szélesebb körben használja fel ezen segédanyagokat: például Franciaországban és Belgiumban kihasználva a ciklodextrinek koleszterin kivonó képességét, β-ciklodextrin felhasználásával csökkentett koleszterintartalmú vajat állítanak elő [4].

A ciklodextrinek, mint oldékonyságot és felszívódást fokozó segédanyagok, már régóta megtalálhatóak a gyógyszerkönyvben. A hidroxi-propil-béta-ciklodextrint 2010-ben a Food and Drug Administration (FDA), majd 2011-ben a European Medicines Agency (EMA) felvette a C-típusú Niemann Pick szindróma kezelésére szánt lehetséges gyógyszerek közé. Mindemellett kimutatták, hogy a hidroxi-propilbéta-ciklodextrin (HBPCD) neuroprotektív hatású lehet Alzheimer-kórban [5].

Ezen molekulák membránhatása [6], valamint a sejtekbe történő felvétele jól ismert [7]. Valójában a ciklodextrinek eddig feltárt celluláris hatásai a membránnal

történő interakcióra és a β -ciklodextrinek koleszterin-, α -ciklodextrinek foszfolipidkomplexálására vezethető vissza. Citotoxikus és hemolizáló hatásuknak is ez az alapja. Ismert azonban, hogy a sejtekbe endocitózis útján bejuthatnak, azonban a ciklodextrinek intracelluláris sorsát és hatásait eddig részletesen még nem vizsgálták.

Az ilyen széles körben alkalmazott segédanyagok esetében fontos, hogy minél többet tudjunk a sejtekre gyakorolt, illetve sejten belüli hatásairól. Az alábbi kutatással hozzájárultunk a ciklodextrinek biztonságos alkalmazhatóságához.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A ciklodextrinek

A ciklodextrinek kutatása 1891-ben kezdődött el Franciaországban, amikor is Antonie Villiers francia gyógyszerész, kémikus felfedezte, hogy a keményítő fermentálódása során egy ismeretlen anyag kristályosodik ki. Ezt elnevezte "cellulosine"-nak, mivel feltételezte, hogy ez valamilyen cellulóz származék. 1903-ban az osztrák kémikus, bakteriológus Franz Schardinger izolálta a *Bacillus macerans* nevű mikroorganizmust, amely keményítő tartalmú táptalajon növesztve kétféle kristályos anyagot termelt. A két kristályos anyag hasonlított a Villiers által felfedezett cellulosine-ra, ezért Schardinger α -, és β - dextrinnek nevezte el őket. A ciklodextrinek ciklikus szerkezetét az 1930-as évek második felétől ismerjük, köszönhetően Karl Johann Freudenberg német kémikusnak és munkatársainak. Ők azt állapították meg, hogy ezek a dextrinek maltóz egységekből épülnek fel és α -1,4- glikozidos kötéseket tartalmaznak. A ciklikus szerkezetet először 1942-ben Dexter French amerikai kémikus, biokémikus demonstrálta, aki elnevezte cikloamilóznak a dextrineket [8].

Az 1950-es évek elejétől kezdtek el intenzívebben foglalkozni a ciklodextrinek kutatásával, az enzimatikus előállításával, izolálásával és karakterizálásával. A French által vezetett kutatócsoport felfedezte, hogy vannak még nagyobb méretű ciklodextrinek is, míg a német kémikus Friedrich Cramer által vezetett kutatócsoport a ciklodextrinek komplexképző tulajdonásgainak felderítésével foglalkozott. Emellett a ciklodextrin elnevezés is Cramer-től származik. Az első szabadalom 1953-ban Freudenberg, Cramer és Plieninger nevéhez fűződik. A három kémikus számos példával alátámasztva lefedte a ciklodextrinnel való komplexálás előnyös tulajdonságait, mint az oxidációra érzékeny hatóanyagok védelme, oldékonyság növelése, valamint az illó anyagok megkötése [9].

A ciklodextrineket részlegesen előhidrolizált keményítőből állíthatjuk elő. Az aciklikus dextrinek keverékét a fentebb említett mikroorganizmus, a *Bacillus macerans* által is termelt enzim, a ciklodextrin-glikozil transzferáz alakítja át ciklikus dextrinekké. Az így keletkezett molekulák nem redukáló oligoszacharidok, homogén kristályos anyagként állíthatóak elő, tisztaságuk pedig meghaladhatja a 99,5 %-ot [10]. A ciklodextrineket kémiai szerkezetük alapján három nagy csoportra oszthatunk. Az α -ciklodextrinek 6, a β -ciklodextrinek 7, míg a γ -ciklodextrinek 8 glükopiranóz egységből épülnek fel, α -1,4- glikozidos kötésekkel összekapcsolva. A molekulák belső ürege apoláris, míg a külső felszíne poláris, azaz vízben jól oldódó. Ez az egyedi sajátságuk lehetővé teszi, hogy más molekulákat magukba zárjanak, azaz molekuláris kapszulaként viselkedjenek [11].



1.ábra: A ciklodextrinek szerkezete [9]

A ciklodextrin molekulákon számos szabad hidroxilcsoport található- a βciklodextrinen 21 darab- melyeket különféle szubsztituensekkel láthatjuk el. Ez a szubsztituálás leggyakrabban hidroxialkilezés (HPBCD), metilezés (RAMEB), acetilezés vagy szulfobutilezés. A gyűrűk szubsztituálásával nagyon sokféle származék állítható elő, azonban fontos, hogy a módosított származék se legyen toxikus, illetve ne veszítse el komplexképző tulajdonságát. A szubsztituált ciklodextrineket a szubsztitúciós fokkal jellemezzük (degree of substitution, DS), mivel a szubsztituálás általában random módon történik.

A ciklodextrin gyűrűn található szabad hidroxilcsoportok funkcionális módosításával és kovalens kötésekkel lehetőségünk van nagyobb struktúrák kialakítására is. A hidroxilcsoportok eltérő reaktivitást mutatnak, a 2,6-OH csoportok a legreaktívabbak. A főbb módosítási lehetőségek a deprotonáció, dehidráció és kondenzáció [12]. Ciklodextrin polimerről akkor beszélünk, ha egy molekulán belül több ciklodextrin monomer található. A polimerek előállítása deprotonációval történik, mely során a savas hidroxilcsoport egy erős bázissal aniont képez. Ez az anion szükséges az SN2 típusú polimerizációhoz is. A ciklodextrin polimerek térhálósítására leggyakrabban epiklórhidrint használnak, mely a fent említett módon reagál a ciklodextrin gyűrűvel [13].

A ciklodextrin polimerek megnövelt lehetőséget kínálnak a ciklodextrinek alkalmazhatóságára, hiszen növelik az esélyét a hatóanyag és ciklodextrin ürege közötti interakciónak [14]. A polimereket többféle módon csoportosíthatjuk. A reakciótól és a hidroxilcsoport szubsztituálásától függően előállíthatunk vízoldékony és oldhatatlan polimereket. Az előállított polimer vízoldhatósága függ a monomerek számától- a monomerek számának növekedésével csökken a vízoldhatóság-, mely a reakció idejétől, az alkalmazott szubsztituensektől és térhálósítóktól függ [15]. A másik csoportosítás alapján a polimerek lehetnek egyenes vagy elágazó láncúak, térhálós szerkezetűek. Manapság a vízoldékony ciklodextrin polimereket a gyógyszeriparban még csak a kutatásokban alkalmazzák segédanyagként, oldékonyság növelőként, akárcsak a monomereket. Az oldhatatlan ciklodextrin polimereket pedig az analitikában használják főként, különböző gyógyszermaradványok, hatóanyagok és szennyezőanyagok extrakciójára vizes oldatokból [16,17].

A ciklodextrineknek jól ismert biológiai hatásai vannak, melyek nagymértékben meghatározzák alkalmazhatóságukat és biztonságosságukat. Komplexképző tulajdonságaiknak köszönhetően képesek a sejtmembránban is megtalálható, természetes hidrofób molekulákat is komplexálni, mely hatásuk korrelációt mutat a citotoxicitásukkal. Az α -ciklodextrin a foszfolipideket [18,19], míg a β -ciklodextrin a koleszterint képes kivonni a sejtmembránból [20]. A lipid szolubilizáció mértéke függ а ciklodextrin molekula sajátságaitól, így a gyűrű méretétől, valamint szubsztituáltságától [21]. Mindemellett a ciklodextrinek dózisfüggő módon képesek komplexálni a fent említett lipideket, ezáltal dózisfüggő citotoxicitást és hemolitikus aktivitást mutatnak [22]. Kiss T. és munkatársai bebizonyították, hogy összefüggés van a β-ciklodextrinek citotoxicitása, hemolitikus aktivitása és a koleszterin szolubilizáló tulajdonságaik között. Caco-2 intesztinális epitél sejteken vizsgálva, azt találták, hogy a metil-β-ciklodextrin volt a leginkább citotoxikus, míg az ionos származékok vagy a hidroxi-propil-csoporttal szubsztituálás csökkentette való а származékok citotoxicitását [23]. A metilcsoportok számának növelésével nő a koleszterin kivonó képesség [24]. Hasonló korrelációt mutattak ki az α -ciklodextrinek esetében is [25]. A sejtmembrán koleszterin tartalmának csökkenése, ezáltal a szerkezetének megváltozása számos következménnyel járhat. Lambert és munkatársai kimutatták, hogy a koleszterin depléciója csökkenti a transzmembrán elektromos ellenállást (TEER), ezáltal növelve a dextrán paracelluláris permeabilitását Caco-2 sejteken [26]. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy a koleszterin extrakció destabilizálja a tightjunction fehérje komplexeket. Mindemellett a koleszterin kivonása, komplexálása a βciklodextrin által csökkentheti a sejtmembránban található efflux transzporterek, így az ABC transzporterek funkcióját, melyek fontos szerepet töltenek be az intesztinális barrierben [27]. A P-glikoprotein egy olyan transzportfehérje, amely visszapumpálja a szubsztrátjait az intesztinális lumenbe, ezáltal gátolva az abszorbciójukat. Ezen pumpa konformációjára, ezáltal működésére befolyással van a sejtmembrán koleszterin tartalma [28]; annak csökkenése gátolja a pumpa működését [29].

Az utóbbi években a hidroxi-propil-béta- ciklodextrin (HPBCD) koleszterin kivonó képességét egy ritka recesszíven öröklődő betegség, a C típusú Niemann-Pick szindróma kezelésében alkalmazzák. A betegség során a koleszterin intracelluláris tárolása és szállítása gátolt az NPC1 és NPC2 gének mutációja miatt. Az NPC1 egy tanszmembán fehérje, ami részt vesz a szubsztrátok retroendocitotikus transzprotjában, az NPC2 pedig egy lizoszómális fehérje, ami köti a koleszterint [30]. NPC1 esetén a ciszteinben gazdag luminális hurok missense mutációja, még NPC2 esetén számos mutációt leírtak már (frame shift, iniciációs kodon mutációja). Ezen

mutációk miatt az NPC2 nem tudja megkötni a koleszterint, az NPC1 pedig nem tudja átvenni a koleszterint az NPC2-től és elszállítani azt a késői endoszómából vagy lizoszómából az endoplazmatikus retikulumba [31]. Ennek következtében a nem észterezett koleszterin kóros módon akkumulálódik az agy, máj és a lép sejtjeinek lizoszómáiban, ezáltal neurodegeneratív elváltozásokat okozva [32]. Ory és munkatársai azt találták, hogy a HPBCD endocitózissal felvételre kerül a sejtekbe ezáltal képes az akkumulálódott koleszterint komplexálni a késői endoszómákból [5]. Ez a felfedezés vezetett a HPBCD klinikai alkalmazásához [33,34]. 2010-től a Food and Drug Administration (FDA), majd 2011-től az European Medicines Agency (EMA) is törzskönyvezte a HPBCD-t a C- típusú Niemann Pick szindróma kezelésében alkalmazott önálló gyógyszerként. Állatkísérletekben kimutatták, hogy a HPBCD neuroprotektív hatású Alzheimer- kór esetén [35], mivel gátolja a fehérjék, mint az amiloid-β aggregációját [36].

Ahhoz, hogy a fent említett neuroprotektív hatásaikat kifejtsék, а ciklodextrineknek át kell jutniuk a sejtmembránon. Nagy molekulaméretüknek és hidrofil sajátosságaiknak köszönhetően nem képesek passzív diffúzióval átjutni a plazmamembránon [6]. A biológiai barriereken történő átjutásra, valamint a lipofil hatóanyag penetrációjának fokozására több mechanizmust is leírtak már. Az első ilyen mechanizmus a felszívó hámon kifejtett hatás. Ez a már fentebb említett, a ciklodextrinek koleszterin komplexáló tulajdonságával van kapcsolatban. A koleszterin komplexálásával megváltozik a sejtmembrán szerkezete, összetétele, ezáltal a barrier funkció [37]. Ezeken a lipofil biológiai barriereken csak kis mennyiségű hidrofil ciklodextrin molekula képes átjutni, azonban ha fölöslegben maradnak extracellulárisan, akár csökkenthetik a lipofil hatóanyag penetrációját [6]. A második mechanizmus az aktív transzporterek gátlása. Ezen hatás is a koleszterin komplexáló tulajdonsággal függ össze. A sejtmembránban számos aktív transzporter található (például az általunk is vizsgált P-glikoprotein), melyek a hatóanyagot a bél lumene felé pumpálják, ezáltal csökkentve a hatóanyag felszívódását. Ahogyan már fentebb is említettem a koleszterin extrakciója a mebránból, annak megváltozását okozza. Ezáltal megváltozik a pumpafehérjék konformációja, és működése [38,39]. A harmadik mechanizmus pedig az általunk is vizsgált endocitotikus folyamat. Ezen mechanizmus a sejtek egyik legfontosabb képessége, hiszen a sejt így is kommunikál a környezetével [40]. Az endocitózis során a felvételre került hatóanyag, kutatásunk esetében a ciklodextrin egy úgynevezett primer endoszómába kerül, melyben elszállítódik a korai endoszómákhoz. Az endoszómális érés során a korai endoszómából késői endoszóma lesz, amely fuzionál a lizoszómával, ahol majd az endoszóma tartalma degradációra kerül [41]. Az emlőssejtekben számos endocitotikus útvonalat különböztetünk meg a résztvevő fehérjéktől és lipidektől való függőségüktől (2. ábra) [42]. Két nagy típust ismert: az egyik a fagocitózis, mely során elsősorban fagociták (makrofágok, dendritikus sejtek és monociták) képesek felvenni szilárd részecskéket. A fagocitózis funkciója a patogének, baktériumok eltávolítása a sejtekből. Ez egy a sejtfelszíni receptorok által erősen kontrollált, energiaigényes folyamat [43]. A másik pedig a pinocitózis, vagy más néven folyadék fázisú endocitózis, mely során a sejt folyadékot képes felvenni. A pinocitózis minden emlőssejt esetében megtalálható és további alcsoportokra osztható. A klasszifikáció a vezikulák mérete, a keletkezésük mechanizmusa, valamint a folyamatban részt vevő fehérjék alapján történik [44]. Az egyik a klatrin-mediált endocitózis, mely során az extracelluláris folyadékot a sejtmembránban található proteinek, sejtfelszíni receptorok megkötik, majd az klatrinnal bevont membrán lefűződésekbe kerül, amelyből vezikulák lesznek [45]. Az így keletkezett vezikulák átmérője 60-80 nm. Ezen folyamat egyik gátlószere a klórpromazin [46], amely hatása erősen sejtfüggő. Egyes sejttípusokon a klórpromazin fokozza az endocitózist [47], mely azzal magyarázható, hogy más endocitotikus útvonalak azonban aktiválódnak, vagy pedig ez a kationos amfifil molekula növeli a membrán fluiditását. Plazzo és munkatársai fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva HeLa sejteken azt találták, hogy a fluoreszceinnel jelölt RAMEB tartalmú vezikulumok a mebrán közelében maradtak [48]. Másik ilyen folyamat a makropinocitózis, mely során a sejt membránlefűződéseket hoz létre, majd a lefűződés fúzionál a sejtmembránnal és nagyobb vezikulumok kelezkeznek belőle miközben a körbe zárt folyadékot bekebelezi. Ezeket a vezikulumokat makropinoszómáknak nevezzük, méretük pedig nagyobb, mint 1 µm. Ebben a folyamatban, akárcsak a fagocitózis során az indukálást kiváltó szignálkaszkádban szerepet játszanak az Rho-család GTPázok [49]. A makropinocitózist több útvonalon is tudjuk gátolni: a protein kináz C gátlószere a rottlerin, míg a wortmannin és az LY294002 a foszfoinozitid-3-kinázt (PI3K) gátolják [50,51]. A pinocitózis harmadik kaveloa-mediált endocitózis. kaveola változata а А egy lombik alakú membránbetüremkedés, melynek jellegzetes komponense a kaveolin fehérje illetve a koleszterin. A koleszterin kivonásával a membránból a kaveola szétesése figyelhető meg [52]. A kaveola csak lassan internalizálódik, ezért ez a folyamat lassú. Az endocitózis során kb. 60 nm átmérőjű hólyagok keletkeznek, amelyek kis mennyiségű folyadékot szállítanak a sejtekbe [53]. A kaveola-mediált endocitózis gátlószere a filipin, amely megköti a szabad, nem észterezett koleszterint, ezáltal a sejtmembrán deformálódása, roncsolódása megy végbe. A negyedik alcsoport pedig a klatrin-, és kaveola-független endocitózis, amely a legkevésbé felderített mechanizmusa az endocitózisnak. Ez a folyamat a neuronokban, illetve a neuroendokrin sejtekben is megtalálható, ahol a membránfehérjék stimuláció utáni visszaállításában, azaz a szinaptikus vezikulák újrahasznosításában van szerepe. A mechanizmus során keletkezett vezikulák mérete kb. 90 nm.



2. ábra: Az endocitózis típusainak sematikus ábrája [42]

A különböző endocitotikus útvonalokon felvett anyagok korai, majd az enoszómák érése során úgynevezett késői endoszómákba kerülnek. A késői endoszóma szekretálhatja tartalmát az extracelluláris térbe, fúzionálhat a lizoszómával, ahol a savas pH és lizoszómális enzimek (hidrolázok, poteázok) által a tartalma lebontásra kerül, majd a lizoszóma fúzionálva a sejtmembránnal, tartalmát lizoszómális exocitózis útján az extracelluláris térbe szekretálja. Emellett a késői endoszóma fúzionálhat az autofagoszómákkal, melyek a citoszólban található károsodott, aggregálódott fehérjéket, kórosan működő sejtkompartmenteket zárjuk magukba. A késői endoszóma és autofagoszóma fúziójaként képződő organellumot amfiszómának hívjuk, melyek a plazmamembránnal való fúziót követően amfiszómális szekréció útján tartalmukat az extracelluláris térbe szekretálják, vagy a lizoszómával fúzionálhatnak, ahol a tartalmuk lebontásra, majd lizoszómális exkréció útján az extracelluláris térbe szekretálódásra kerül (3. ábra) [54].



3.ábra: Az endocitotikus úton felvett anyagok intracelluláris sorsa [55].

3.2 Az NF- kappa B útvonal

A nukleáris faktor kappa B (NF-kB) transzkripciós faktor család fontos szabályozója szervezetünk immunrendszerének fejlődésében, valamint az immunválaszok, gyulladás kialakulásában [56,57]. Ez a dimer transzkripciós faktor központi szerepet játszik a veleszületett és az adaptív immunitás kialakításában, a sejtek differenciálódásában, proliferációjában és túlélésében. Az NF-kB jelátviteli útvonal- amely magába foglalja az NF-κB dimerek közötti kölcsönhatásokat, valamint az IkB szabályozókat és az IKK komplexeket- számos ingerre reagál és a receptorligandum kölcsönhatás következtében aktiválódik [58]. Ezen jelátviteli rendszer szigorúan szabályozott, a jelátviteli útvonal hibás szabályozása számos betegség kialakulásában, így például a gyulladásban és a rákos megbetegedésekben is szerepet játszik. Ennek köszönhetően ígéretes terápiás célpontok lehetőségét kínálja ez a jelátviteli útvonal számos betegség kezelésében. Az NF-ĸB öt fehérje monomerből áll. Ez az öt fehérje a p65 vagy RelA, a RelB, a cRel, a p50 és a p52 alegység, melyek normál esetben, inaktív formában a citoplazmában találhatóak meg, azonban, ha a sejtmagba transzlokálódnak, ott kötődnek a DNS-hez. Ezek a fehérjék különböző dimereket alkothatnak, mely hetero- vagy homodimerek különböző DNS-kötő affinitással rendelkeznek. A különböző sejtek, különböző NF-ĸB dimereket fejeznek ki [59]. Ez a folyamat két útvonalon szabályozható. Az egyik az általános útvonal vagy más néven NF-kB esszenciális modulátor (NEMO)- függő útvonal. A kanonikus útvonalat a NEMO adapter fehérjéből és két kinázból (IKK α és IKK β) álló kináz komplexek közvetítik. Számos gyulladásos stimulus hatására aktiválódik a NEMO fehérjét és

IKK-t tartalmazó komplex, amely foszforilálja az NF-κB- hez kötött IKKβ-kat, amelyek így proteoszómális lebontásra kerülnek. Ezáltal szabaddá válik az NF-κB, amely transzlokálódik a sejtmagba, ahol kötődik a DNS-hez és aktiválja a génexpressziót. A kináz komplexet számos citokin- például tumor nekrózis faktor alfa (TNF α)- [60], a kórokozókkal társult molekuláris mintázat, vagy az antigének által kiváltott immunstimuláció is aktiválhatja. Ennek az útvonalnak önszabályozása is lehetséges, mely során az IkB transzkripciós indukció hatására újra szintetizálódik és képes a sejtmagba transzlokálódni. A sejtmagban megköti az NF kB alegységet, visszaszállítja a citoplazmába, ezáltal gátolja annak hatását [59]. A másik útvonal a nem általános, más néven NEMO-független útvonal. Ez a mechanizmus szerepet játszik a B-sejtek túlélésében és érésében, a dendritikus sejtek aktivációjában, valamint a csontanyagcserében is. Különböző fejlődési stimulusok hatására a NIK/ IKK1 komplex aktiválódásának következtében foszforilálódik a p100. A foszforiláció során a p100 p52-vé alakul, amely kötődik a RelB-hez. A kialakult dimer a sejtmagba transzlokálódik, ahol a DNS-hez kötődve aktiválja a transzkripciót. A p100 alegység nagyrésze nagy molekulatömegű gátló komplexekben található meg. Ezekben a komplexekben is foszforilálódik ez az alegység, mely részleges degradációhoz ezáltal az NF-κB felszabadulásához vezet. A szabad alegység így bejut a sejtmagba és korai génexpressziót vált ki, míg a p52: RelB dimernek a késői génexpresszióban van szerepe. Ez a gyulladásos útvonal alternatív útvonalakon is aktiválódhat. O' Dea El és munkatársai leírták, hogy ultraibolya (UV) sugárzás által kiváltott ribotoxikus stressz hatására gátlódik az IKβ szintézise, melynek következtében nő a szabad NF-κB molekulák száma, amelyek így a sejtmagba transzlokálódva génexpressziót váltanak ki [61].



4.ábra: Az NF-κB útvonal sematikus ábrája [62]

A ciklodextrinek NF-kappa B útvonalra gyakorolt hatását eddig még csak makrofágokon vizsgálták. Motoyoma és munkatársai azt találták, hogy a dimetil- alfaciklodextrin gátolja a makrofágok LPS (lipopoliszacharid) indukálta stimulációját [56]. Magdalena Banach-Orlowska és munkatársai a sejt koleszterin zavarának hatásait vizsgálták a limfotoxin β receptor (LT β R) által kiváltott NF- κ B jelátvitelre. Azt találták, hogy a plazmamembrán metil-béta-ciklodextrin által okozott koleszterin depléciója fokozza az NF- κ B LT β R általi aktivációját [63].

3.3 Autofágia

Az autofágia a citoplazmatikus komponensok lizoszómán belüli lebontását jelenti. Ez egy önemésztő folyamat, melynek célja a károsodott, aggregálódott fehérjék, a kórosan működő endoplazmatikus retikulum, peroxiszóma vagy mitokondrium eltávolítása a sejtből [64]. A folyamatnak számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban van kulcsfontosságú szerepe, mint például az energiaháztartás, az öregedés gátlása és a mikroorganizmusok eliminációja a sejtekből [65]. Az autofágiának három fő típusát különböztetjük meg: a makro-, mikro- és chaperon-

mediált autofágiát. A makroautofágia során a citoplazmatikus komponensek az autofagoszómán keresztül elszállítódnak a lizoszómába, ahol degradációra kerülnek. A folyamat induktora leggyakrabban valamely esszenciális tápanyag, általában az aminosavak hiánya. A tápanyag jelátviteli folyamat fő szabályozói az mTOR receptorok, melyek gátlása például rapamicinnel indukálja az autofágiát élesztőkben [66]. A folyamat első lépése egy izolációs membrán vagy más néven fagofór képződése, mely egy kettős rétegű lipidmembrán, amely az endoplazmatikus retikulumból, a Golgi készülékből vagy az endoszómákból származik [67]. A fagofór képződését a Beclin- 1/ VPS34 komplex szabályozza. A következő lépés a fagofór multimerizációja, melyben fontos szerepe van az Atg5-Atg12 konjugációjának és interakciójának az Atg16-tal. Ezt követően a mikrotubulus asszociált fehérje könnyű lánc (LC3B) szintézise valósul meg, melyet az Atg8 kódol. Az LC3B-ből egy proteolitikus hasítással az Atg4 cisztein proteáz által LC3B-I keletkezik, melyből LC3B-II keletkezik, amely beépül a növekvő fagofórba. A molekula beépülése az Atg5-Atg12 komplextől függ, beépülést követően pedig megtalálható az autofagoszóma külső és belső felszínén egyaránt. Szerepe van a membránok későbbi fúziójában, valamint az autofagoszómába felvételre kerülő komponens kiválasztásában [68]. Ezután a target felvételre kerül az autofagoszómába. Ez általában véletlenszerűen történik. Ezt Eskelinen és munkatársai elektronmikroszkópos felvételekkel is alátámasztották, hiszen a felvételek gyakran változatos tartalmú (mitokondrium, ER- és Golgi membrán) autofagoszómákat mutattak [69]. Azonban egyre több bizonyíték van arra, hogy a növekvő fagofór membránjába beépülő LC3B-II molekula receptorként funkcionál, ezáltal biztosítva az aggregálódott proteinek vagy a mitokondriumok szelektív felvételét az autofagoszómába. A target felvételével egy időben néhány LC3-II/Atg8 molekula újrahasznosítása is megtörténik az Atg4 által. A folyamat utolsó lépése az autofagoszóma fúziója a lizoszómával, ahol a target a lizoszómális proteázok által proteolitikus lebontásra kerül. A fúzió következtében kialakult kompartmentet autolizoszómának nevezzük. A mikroautofágia során a citoszolikus komponenseket közvetlen a lizoszóma veszi fel. A makro-, illetve mikroautofágia lehet szelektív vagy nem szelektív. Szelektív autofágia során a target komponensek az autofágia receptorokhoz kötődve kerülnek felvételre a lizoszómákba, ahol degradációra kerülnek. A szelektív autofágiának fontos szerepe van a különböző sejt-organellumok, mint péládul a mitokondriumok, a peroxiszómák, a lizoszómák, a sejtmag vagy az endoplazmatikus retikulumok újrahasznosításában, ezáltal az energiaháztartás fenntartásában [70]. A szelektív autofágiában számos receptor és útvonal játszik szerepet. A mitokondriumok szelektív autofágiáját mitofágiának, a lizoszómákét lizofágiának, a sejtmagok emésztését nukleofágiának, míg a patogének eliminációját a sejtekből xenofágiának nevezzük [71]. Az autofágia diszfunkciója szoros kapcsolatban áll különböző betegségekkel, mint például az öregedés, különböző neurodegeneratív és rákos megbetegedések, metabolikus és szív diszfunkciók, valamint a gyulladás. A szív esetében az autofágia fontos szerepet játszik a sejtorganellumok szabályozásában normál körülmények között. Az autofágia alulműködése, azaz diszfunkciója zavarhatja a szív szerkezeti és funkcionális homeosztázisának fenntartását, felgyorsítja a szív öregedését. A szív örgedése során az autofágiás flux általában csökken, ami az aggregálódott fehérjék, károsodott sejtorganellumok felhalmozódásához vezet a sejtekben. A szívben a hemodinamikai stressz és az öregedés mitokondriális károsodást okoz, ami fokozott oxidatív stresszhez, így gyulladáshoz vezethet. A károsodott mitokondriumok autofágiájának, azaz a mitofágiának fontos szerepe van a szívelégtelenséget kiváltó gyulladásos folyamatok elkerülése érdekében [72]. A chaperon- mediált autofágia során a target fehérjék a lizoszómális membránon keresztül chaperon fehérjékkel komplexben kerülnek felvételre. A chaperon fehérjéket a lizoszóma membránjában megtalálható lizoszóma- asszociált membrán receptor 2A (LAMP- 2A) ismeri fel [73].



5. ábra: Az autofágia folyamatának sematikus ábrája [64]

Kameyama és munkatársai leírták, hogy a folát kapcsolt metil-béta-ciklodextrin indukálja a mitokondriumok szelektív eliminációját, a mitofágiát [74]. Sun és munkatársai azt találták, hogy a hidroxi-propil-béta-ciklodextrin 20 mM-os koncentációban gátolja az AKT/mTOR útvonalat, az autofagoszómák fúzióját a lizoszómával, ezáltal elősegíti az autofagoszómák felhalmozódását HepG2 sejtekben [75]. A ciklodextrinek befolyásolhatják a sejtmembrán működését, kölcsönhatásba léphetnek különböző fehérjékkel, úgy mint az AMP-aktiválta protein- kinázok, β amiloid fehérje vagy KV1.3 ioncsatorna [76–78]. A kölcsönhatás következtében ezen fehérjék károsodása is felmerülhet és ezáltal az autofágia indukálódhat a sejtekben.

3.4 siRNS

Az siRNS vagy más néven rövid interferáló ribonukleinsav, egy általában 20-27 bázispárból álló kettős szálú, nem kódoló DNS molekula, melynek a géncsendesítésben van szerepe [79]. Manapság az siRNS alapú terápiák egyre nagyobb szerepet kapnak a különböző betegségek kezelésében. Számos siRNS-alapú terápia áll fejlesztés alatt az örökletes betegségektől a rákos megbetegedések kezeléséig. Ahhoz, hogy a terápia sikeres legyen egy biztonságos és hatékony szállító rendszerre van szükség, hiszen a molekula transzfektálása, azaz bejuttatása a sejtekbe számos kihívás elé állítja a kutatókat. Az siRNS nagy molekulamérete és polianionos jellege (negatív töltésű) miatt a módosítatlan molekula nem tud könnyen bejutni a sejtekbe, valamint a véráramban instabil és immunogén lehet [80]. Ezen probléma kiküszöbölésére számos rendszer áll rendelkezésre, illetve fejlesztés alatt. Ezeket a rendszereket úgy kell kialakítani, hogy biztonságot nyújtsanak a proteázok ellen, kibújjanak az immunrendszer elől, bejussanak a célsejtekbe és bejuttassák az siRNS-t a RISC komplexbe [81]. A különböző rendszerek általában receptor mediált endocitózissal kerülnek felvételre a sejtekbe, melyet különböző target ligandok beépítésével érnek el, melyet a sejtek felszínén lévő receptorok ismernek fel [82]. Az egyik ilyen rendszer, amely az első DNS plazmid alapú nanopartikulum volt, és a rák kezelésére szántak a ciklodextrin polimer alapú nanopartikulumok. Ezeket más néven polyplexeknek nevezzük. Amint fentebb már említettem, a kationos ciklodextrin polimerek ciklodextrin monomerek összekapcsolásával jönnek létre, amino funkcióscsoportokat tartalmazva. Ezeknek az aminocsoportoknak köszönhetően a polimer a negatív töltésű nukleinsavak, így az siRNS kondenzációját okozza. Ezeket a nanopartikulumokat a jobb celluláris internalizáció és szállítás érdékeben különféleképpen lehet módosítani. Ilyen például polietilén-glikollal (PEG) való módosítás, mely megakadályozza, hogy a rendszert aggregálják a szérumfehérjék, azonban ez a módosítás csökkenti a celluláris internalizációt [80]. Ezeknek a rendszereknek számos előnye van, úgy, mint például a kationos polimerek alacsony toxicitása, az siRNS könnyű kondenzálása, valamint, hogy módosításokkal sztérikusan lehet stabilizálni a nanopartikulumokat. A másik ilyen rendszer a lipid nanopartikulumok, vagy más néven lipoplexek. A lipolexek az siRNS-ből és liposzómákból állnak. A liposzómák gömb alakú liposzómák, melyek legalább egy kettős lipidrétegből állnak egy belső hidrofil üreggel. A lipidrétegek különböző lipidekből állnak, melyek lehetnek pozitív és/ vagy negatív töltésűek és ionozálható molekulák. A negatív töltésű siRNS-t a pozitív töltésű liposzómákba lehet könnyen becsomagolni, mely nanopartikulumnak pozitív töltése marad, de ez jóval alacsonyabb, mint magáé a liposzómáé [83]. A liposzómákat, csakúgy, mint a polimereket is lehet PEG-gel módosítani, ezátal úgynevezett lopakkodó liposzómákat kapunk. Ezek, csakúgy, mint a PEGilált polimerek csökkentik a liposzómák endoszómális felvételét, ugyanakkor gátolják az siRNS proteázok általi degradációját, a szérumfehérjék általi aggregációját, valamint az immunrendszer általi idegenként való felismerését [84]. A harmadik siRNS szállító rendszer a siRNS-ligand konjugátumok. Ez egy fejlődő, ígéretes szállítási módszer, melynek előnye, hogy javítja a celluláris internalizációt és sejtspecifikus célzást. Ebben az esetben valamilyen kis molekulát, szénhidrátokat, aptamereket, antitesteket vagy peptideket kötnek kovalensen az siRNS-hez. Ezeknek a konjugátumoknak további előnye, hogy nem szükséges extra, sejtidegen hordozórendszer, ezáltal nő a szervezet általi tolerálhatóságuk, illetve biztonságos alkalmazásuk [85]. Manapság az siRNS transzfektálása a sejtekbe vagy kationos polimert, a polietilén-imint, vagy pedig lipid alapú hordozórendszert a Lipofectamint alkalmazzák.

Az RNS-mediált interferencia (RNAi) egy egyszerű és gyors géncsendesítési módszer. A folyamat első lépése, hogy a duplaszálú RNS molekulából a Dicer enzim hatására, amely egy RNáz III családba tartozó proteáz, kisméretű (21-25 bázispár) RNS molekulák lesznek. Ezt követően az siRNS kapcsolódik az Argonaute (Ago) fehérjéhez, így kialakítva az RNS-indukálta csendesítő komplexet (RISC). A RISC komplexben az siRNS vezető szála, azaz a target mRNS-sel komplementer szála épül be, a másik lebontása kerül. A komplex ezután felismeri a target mRNS-t és ahhoz kapcsolódva, annak degradációját okozva, gátolja a transzlációt [86].



6. ábra: Az RNS interferencia sematikus ábrája [87]

A ciklodextrineket már régóta alkalmazzák az siRNS horozójaként is. Az első ciklodextrin polimer alapú hordozórendszert plazmid DNS szállítására 1999-ben mutatták be. Gonzalez és munkatársai leírták, hogy az újonnan szintetizált kationos béta-ciklodextrin polimerrel végzett *in vitro* transzfekciók összehasonlíthatóak a polietilén-iminnel vagy Lipofectaminnal végzett transzfekciókkal [88]. Azóta a ciklodextrin polimer alapú siRNS hordozórendszerek fejlesztése fellendült, a kezelendő betegségek, a támadáspontok köre pedig szélesedett [89–91]. O' Mahony és munkatársai kationos ciklodextrin polimerrel komplexálva a GAPDH siRNS-t azt találták, hogy 24 órás transzfekciót követően a GAPDH gén expressziója szignifikánsan csökkent egér embrionális hipotalamikus sejteken [92]. Lee és munkatársai Caco-2 sejteken a P-glikoprotein fehérjének, az ABCB1 génexpresszió

4. Célkitűzés

PhD értékezésem céljául tűztük ki, a különböző ciklodextrin származékok celluláris és intracelluláris hatásainak vizsgálatát Caco-2 intesztinális epitél és HeLa méhnyakrák sejtvonalon. Célunk volt:

- a különböző fluoreszcens festékkel (fluoreszceinnel és rhodaminnal) jelölt hidroxi-propil-béta (HPBCD) és random metilezett béta ciklodextrin (RAMEB) származékok celluláris internalizációjának vizsgálata
- az endocitózis mechanizmusának pontosabb felderítése különböző gátlószerek alkalmazásával.
- az NF-kappaB útvonalra gyakorolt hatásuk vizsgálata
- az autofágiára gyakorolt hatásuk vizsgálata
- a sejtekben található lizoszómák vizsgálatát.

A ciklodextrink sejten belüli sorsa eddig kevéssé felderített, ezért fontosnak tartottuk az endocitózist követő történések tanulmányozását és összehasonlítását két különböző sejtvonalon.

Kutatómunkám másik célja ciklodextrin polimer származékok siRNS hordozóképességének vizsgálata Caco-2 intesztinális epitél sejteken. Az ismert, hogy a ciklodextrinek endocitózissal felvételre kerülnek a sejtekbe, illetve, hogy nagyméretű molekulákat is képesek komplexálni, ezáltal bejuttatni a sejtekbe, ahol különböző biológiai hatásokat válthatnak ki. Ezért a makromolekulák komplexálásának és endocitózisának vizsgálatára az siRNS-t választottuk, mellyel későbbi vizsgálataink során a GAPDH és Pgp expressziójára gyakorolt hatását szeretnénk vizsgálni. Célunk volt:

- különböző mólarányú poliplexek képzése GAPDH siRNS-sel
- a formulált poliplex tulajdonságainak vizsgálata
- a formulált polyplexek celluláris internalizációjának vizsgálata

5. Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált anyagok

Az alább felsorolt ciklodextrin származékok a CycloLab Kft. (Budapest, Magyarország) termékei:

- (2-hidroxipropil)-β-ciklodextrin (HPBCD) (DS~4,5)
- random metil-β-ciklodextrin (RAMEB) (DS~12)
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-fluoreszceiniltioureido]-HPBCD (FITC-HPBCD)
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-fluoreszceiniltioureido]-RAMEB (FITC-RAMEB)
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-rhodaminiltioureido]-HPBCD (Rho-HPBCD)
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-rhodaminiltioureido]-RAMEB (Rho-RAMEB)
- epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony-β-ciklodextrin polimer (BCDPS)
- fluoreszceinnel jelölt epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony β-ciklodextrin polimer (FITC-BCDPS)
- epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony kvaterner-amino-béta-ciklodextrin polimer (QABCDPS)
- epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony mono-amino-béta-ciklodextrin polimer (NHBCDPS)
- fluoreszceinnel jelölt epiklórhidrinnel térhálósított vízoldékony kvaterneramino-béta-ciklodetrin polimer (FITC-QABCDPS)

A kísérleteink során használt LC3B Antibody Kit for Autophagy, a LysoTracker [®], valamint a Silencer [™] siRNA Labeling Kit with Cy3 [™] dye a ThermoFisher Scientific (Magyarország); a CYTO-ID Autophagy Detection Kit az Enzo Life Science (Magyarország) termékei, minden más kísérleti anyag a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke.

5.2 Sejttenyésztés

Az általunk használt Caco-2 és HeLa sejtvonal a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből (European Collection of Cell Cultures, ECACC UK) származnak. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO₂ atmoszférájú inkubátorban tartottuk fenn rendszeres passzálás segítségével. Az alkalmazott médium a DMEM (Dulbecco's modified Eagel's Medium), amelyet kiegészítettünk 10% inaktivált borjú szérummal (Fetal Bovine Serum, FBS), 1% nem esszenciális aminosavval és 1% penicillin-streptomycin oldattal. A Caco-2 sejtek passzázs száma 37-52, míg a HeLa sejtek passzázs száma 18-30 közötti volt.

5.3 Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópiával végzett vizsgálatok esetén a különböző kezelési és festési lépéseket követően az alábbiak szerint jártunk el. A sejtmagokat megfestettük DAPI festékkel (283 nM) 10 percig szobahőmérsékleten. A sejteket egyszer mostuk HBSS-sel, majd a fedőlemezeket tárgylemezre ragasztottuk és a mintákat másnap fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioscope A1, Jena, Németország) vizsgáltuk. A minták vizsgálatához a következő szűrőket alkalmaztuk: DAPI: excitációs G 365 nm, emissziós BP 445/50 nm; fluoreszcein: excitációs BP 470/40 nm, emissziós BP 525/50 nm; rhodamin: excitációs BP 546/12 nm, emissziós BP 575-640 nm.

5.4 Áramlási citometria

Az áramlási citometriai mérések során a különböző kezelési és festési lépéseket követen a mintákat Becton Dickinson Beckman Coulter FC-500 (Pasadena, CA, USA) vagy Guava EasyCyte 6HT-2L (Merck Ltd., Darmstadt, Németország) áramlási citométerrel mértük. Kísérleteink során a következő szűrőket alkalmaztuk: fluoreszcein: excitációs 488 nm, emissziós 525/30 nm; propidium-jodid: 695/50 nm.

5.5 Ciklodextrinek celluláris hatásainak vizsgálata

5.5.1 Citotoxicitás vizsgálat RTCA módszerrel

A kísérletek során Real Time Cell Analyser (RTCA DP Instrument) (XCelligence system, ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA) segítségével vizsgáltuk a HPBCD és RAMEB citotoxicitását. Ehhez 5000 db (Caco-2) vagy 8000 db (HeLa) sejtet szélesztettünk az aranyelektróddal ellátott sejttenyésztő lemezekre, majd a sejteket 4-5 napig, a megfelelő konfluencia eléréséig növesztettük. Ezt követően különböző koncentrációjú HBSS-ben oldott ciklodextrin oldatokkal kezeltük a sejteket, majd 24 óráig inkubáltuk az oldatokban a sejteket, miközben 5 percenként mértük a készülékkel a sejtindexet. Negatív kontrollként mediumot használtunk. A műszer a letapadt sejtek által kialakított ellenállás segítségével számol egy sejtindexet, melyet a kezelés időpontjára normalizáltunk a szoftver segítségével és normalizált sejtindexként ábrázoltunk.

5.5.2 Ciklodextrinek celluláris internalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

A kísérlet során 50.000 db sejtet szélesztettünk egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre, majd 2-3 nap elteltével, amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát (kb. 50-60%) kezeltük a sejteket. A sejteket egyszer

lemostuk HBSS-sel, majd 30 percig 37 °C-on, sötétben inkubáltuk az 50 µM-os FITC-HPBCD, FITC-RAMEB, Rho-HPBCD, Rho-RAMEB, illetve kontroll minta esetén HBSS-ben. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel, majd 3,7 %-os formaldehid oldatban fixáltuk a sejteket 15 percig, szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel. A mintaelőkészítés utolsó lépseit és a mikroszkópos vizsgálatokat az 5.3 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.5.3 Ciklodextrinek celluláris internalizációjának vizsgálata áramlási citometriával

Áramlási citometriai méréseinket a fluoreszcens mikroszkópiával végzett kísérleteink megerősítésre, valamint az endocitózis mechanizmusának pontosabb felderítése érdekében végeztük el. A kísérletek során a sejttenyésztő flaskában lévő sejteket 0,05 %-os tripszin-EDTA oldattal feltripszineztük, majd kétszer mostuk HBSS-sel és 1x10⁶ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk újra. Ezt követően a sejteket 40 percig preinkubáltuk a gátlószerekkel 37 °C-on vagy gátlószerek nélkül jégen. Az alkalmazott gátlószerek: wortmannin 50 nM, genistein 200 μ M, filipin 1 μ g/ml, nocodazole 10 μ M, LY294002 50 μ M és rottlerin 1 μ g/ml. Ezután a sejteket 30 percig 37 °C-on vagy jégen inkubáltuk 50 μ M-os FITC-HPBCD vagy FITC-RAMEB oldatokban. Az inkubációs idő elteltével a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel, majd az elhalt sejteket megfestettük propidium-jodiddal. A celluláris fluoreszcencia intenzitás méréseket az 5.4 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.5.4 NF-kappa B útvonal vizsgálata

A ciklodextrin származékok NF-κB útvonalra gyakorolt hatásának vizsgálatához egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre 100.000 db sejtet szélesztettünk, majd 2-3 nap elteltével, amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát, elvgeztük a kezeléseket. Először HBSS-sel mostuk a sejteket, majd 30 percig 50 μ M-os HPBCD vagy RAMEB, illetve pozitív kontroll esetében 50 ng/ml koncentrációjú TNF- α oldattal inkubáltuk a sejteket 37 °C-on. Az inkubációs idő elteltével a sejteket kétszer mostuk HBSS oldattal, majd 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk metanol:aceton 1:1 arányú keverékében. Ezt követően a sejteket egyszer mostuk HBSS-sel, majd blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket FBS-sel 15 percig, 37 °C-on. Az inkubációs idő elteltével 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk a sejteket az elsődleges anti-p65 antitesttel (2 μ g/ml; poliklonális nyúl IgG antitest, Sigma-Aldrich), majd négyszer mostuk HBSS-sel. Ezután a sejteket 1 órán keresztül, sötétben, 37 °C-on inkubáltuk a fluoreszcens festékkel jelölt másodlagos antitesttel (5 μ g/ml; Alexa Fluor kecske anti-nyúl antitest, Sigma-Aldrich). Az inkubációs idő eltelte után

négyszer mostuk HBSS-sel a sejteket. A mintaelőkészítés utolsó lépseit és a mikroszkópos vizsgálatokat az 5.3 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.5.5 Autofágia vizsgálata

5.5.5.1 Kvalitatív vizsgálat

Az autofágia kvalitatív vizsgálatához fluoreszcens mikroszkópos technikát, illetve az LC3B Antibody Kit for Autophagy kitet használtuk. A kísérlet elvégzéséhez egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre 100.000 db (Caco-2) vagy 50.000 db (HeLa) sejtet szélesztettünk. Amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát (kb. 50-60%), elvégeztük a kezeléseket. Ehhez mostuk HBSS-sel, majd 50 µM-os HPBCD, RAMEB, Rho-HPBCD és Rho-RAMEB oldatokban, negatív kontroll esetében mediumban, még pozitív kontroll esetében 100 µM-os chloroquine oldatban inkubáltuk a sejteket egy éjszakán keresztül, 37 °C-on. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel, majd 3,7 %-os formaldehid oldatban fixáltuk 15 percig, szobahőmérsékleten. A fixálást követően kétszer mostuk a sejteket HBSS-sel, majd 0,2 %-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk percig, szobahőmérsékleten, mely lépést újabb kétszeri HBSS-sel való mosás követett. Ezt követően a sejteket egy órán keresztül, 37 °C-on az elsődleges anti-LC3B antitest oldatban inkubáltuk (0,5 µg/ml; nyúl poliklonális antitest, ThermoFisher Scientific). Az inkubálást követően a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel, majd 1 órán keresztül, sötétben, 37 °C-on a fluoreszcensen jelölt másodlagos antitest oldatban inkubáltuk a sejteket (5 µg/ml; Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl antitest, Sigma-Aldrich). Az inkubációs idő elteltével háromszor mostuk a sejteket HBSS-sel. A mintaelőkészítés utolsó lépseit és a mikroszkópos vizsgálatokat az 5.3 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.5.5.2 Kvantitatív vizsgálat

Az autofágia kvantitatív vizsgálatához microplate readert és a CYTO-ID Autophagy Detection Kit-et használtuk. A kísérletek során egy 96 lyukú fekete lemezbe szélesztettük a sejteket 10⁴/ well koncentrációban. 2 nap után, amikor a sejtek elérték a megfelelő konflueniát, egyszer mostuk PBS-sel, majd 50 μM-os HPBCD, RAMEB, negatív kontroll esetén mediumban, míg pozitív kontroll esetében 100 μM-os chloroquine oldatban inkubáltuk a sejteket egy éjszakán keresztül, 37 °C-on. Az inkubációs idő elteltével a sejteket egyszer mostuk PBS-sel, majd 30 percig 37 °C-on az alábbi oldatban: 1 μl CYTO-ID[®] Green detektáló oldatot és 1 μl Hoechst 33342 oldatot adunk 1 ml PBS-ben. Ezt követően a sejteket egyszer mostuk PBS-sel, majd mértük a fluoreszcencia intenzitást FLUOstar Optima microplate reader-rel (BMG Labtech, Offenburg, Németország). A mérések során a következő szűrőket alkalmaztuk: CYTO-ID® Green detektáló reagens: excitációs 485 nm, emissziós 520 nm; Hoechst 33342 Nuclear Stain: excitációs 365 nm, emissziós 445 nm. A kit előírása szerint a zöld fluoreszcencia intenzitást normalizáltuk a kék fluoreszcencia intenzitásra.

5.5.6 Lizoszómák vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

A kísérlet során 40.000 db (Caco-2) vagy 50.000 db (HeLa) sejtet szélesztettünk egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre. Amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát (2-3 nap) egyszer mostuk HBSS-sel, majd 50 μM-os fluoreszceinnel jelölt HPBCD vagy RAMEB oldatban inkubáltuk a sejteket 30 percig, 37 °C-on, sötétben. Az inkubáció után a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel, majd 50 nM LysoTracker[®] Red DND-99 festék oldattal inkubáltuk a sejteket 30 percig, 37 °C-on, sötétben. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel, majd 15 percig, szobahőmérsékleten 3,7 %-os formaldehid oldatban fixáltuk a sejteket. A fixálást követően a sejteket háromszor mostuk HBSS-sel. A mintaelőkészítés utolsó lépseit és a mikroszkópos vizsgálatokat az 5.3 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.5.7 Lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával

Åramlási citometriai méréseinket a fluoreszcens mikroszkópiával végzett kísérleteink megerősítésére végeztük el. A kísérletek során a sejttenyésztő flaskában lévő sejteket 0,05 %-os tripszin-EDTA oldattal feltripszineztük, majd a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel és 1x10⁶ sejt/ml koncentrációban felszuszpendáltuk HBSS-ben. Ezt követően a sejteket elő-inkubáltuk 50 μM-os HBPCD, RAMEB, FITC-HPBCD vagy FITC-RAMEB oldatokban 30 percig 37 °C-on, majd tovább inkubáltuk 30 percig inkubáltuk a sejteket 50 nM-os LysoTracker[®] Red DND-99 festékkel 37 °C-on. Ezt követően a sejteket kétszer hideg HBSS-sel mostuk, majd fixáltuk 1%-os paraformaldehid oldatban. A celluláris fluoreszcencia intenzitás méréseket az 5.4 pontban leírtak alapján végeztük el.

5.6 Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképességének vizsgálata

5.6.1 Polyplexek előállítása

A polyplexek előállítása során a különböző ciklodextrin polimerekből, illetve a polietilén-iminből 100 μ M-os vizes törzsoldatot készítettünk. A GAPDH siRNS-t a forgalmazó (Sigma-Aldrich) előírása szerinti módon oldottuk fel nukleáz mentes vízben, így szintén 100 μ M-os törzsoldatot készítettünk. A polimer oldatokhoz

hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű siRNS oldatot, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk az oldatokat. Ezt követően a kísérlethez szükséges koncentrációra hígítottuk a polyplexeket HBSS-sel vagy DMEM mediummal.

5.6.2 A polyplexek tulajdonságainak vizsgálata DLS módszerrel

A polimerek, az siRNS és a polyplexek méreteloszlását lézer fényszórás fotometria (Dynamic Light Scattering, DLS) módszerrel vizsgáltuk. Ehhez 100 µM-os polimer és siRNS oldatokat készítettünk, melyekből előállítottuk a polyplexeket. Az méréseket Zetasizer Nano ZS (Malvern) műszerrel végeztük el, kis térfogatú kvarc küvettában, melyben a mintamennyiség 200 µl volt. A detektálás 175°-os szögben történt 25 °C-os hőmérsékleten. A különböző oldatok méreteloszlását és polidiszperzitását (PDI) háromszor mértük le. A zéta potenciál mérés High Concentration Zeta Cell-ben történt változó feszültségű árammal.

5.6.3 A polyplexek tulajdonságainak vizsgálata gélelektroforézissel

Az siRNS és a polimer közötti kölcsönhatást gélelektroforézissel vizsgáltuk. Az agarózgélt 40 mM Tris bázisban, 20 mM ecetsavban és 1 mM etilén-diamintetraecetsavban (TAE-puffer) készítettük úgy, hogy 2 g agarózt feloldottunk 2 μ l GelRed® 10 000x (Biotium) tartalmú 100 ml TAE-pufferben. A poliplexeket a QABCDP különböző mólarányaiban állítottuk elő, úgy hogy az siRNS koncentrációja 100 vagy 500 nM legyen. 20 μ l mintát összekevertünk 5 μ l géltöltő pufferrel (brómfenol-kék festék), majd felvittük a zsebekbe. Az elektroforézist 80 V-on hajtottuk végre 1 órán keresztül, és a mintákat ChemiDoc Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékkel detektáltuk.

5.6.4 Sejtproliferáció vizsgálata RTCA módszerrel

A polimerek citotoxicitását RTCA (Real Time Cell Analyser) módszerrel határoztuk meg. A kísérlethez 5.000 db Caco-2 sejtet szélesztettünk az aranyelktródokkal ellátott tenyésztőlemezekre, majd a sejteket 2 napig növesztettük. Ezt követően a sejteket további 2 napig inkubáltuk a vizsgált oldatokkal: a polimerek 50 és 100 nM koncentrációjú oldataival, illetve negatív kontroll esetén mediummal. A sejtindexet óránként mértük, melyet a műszer a letapadt sejtek által kialakított ellenállás segítségével számolt ki. Ezeket az értékeket ábrázoltuk.

5.6.5 siRNS fluoreszcens jelölése

A GAPDH siRNS fluoreszcens jelöléséhez a Silencer® siRNA labeling Kit-et használtuk (ThermoFisher Scientific, Magyarország), mely Cy3 vörös színű fluorfort tartalmaz. Az siRNS-ből 100 µM-os törzsoldatot készítettünk, majd nukleáz mentes vízzel 20 µM-os koncentrációra hígítottuk. A jelölést a kit előírása szerint végeztük el. Elsőként a Cy3 reagenst szuszpendáltuk a Reconstitution Solution-ban, majd vortexeltük és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezt követően összemértük a reakcióelegyet, amely nukleáz mentes vizet, 10×Labeling Buffer-t, 20 µM-os siRNS oldatot és Cy3 reagenst tartalmazott. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 37 °C-on fénytől védve inkubáltuk, majd az etanolos kicsapás következett. Ehhez 5 M NaCl és abszolút etil-alkoholt adtunk az elegyhez, majd egy órán keresztül -20 °C-on inkubáltuk tovább az elegyet. Ezt követően 15 percig 15.000 rpm-en centrifugáltuk a precipitátumot, majd a felülúszót óvatosan eltávolítottuk. Ezután 70%-os etilalkohollal mostuk a pelleteket és 5 percig 15.000 rpm-en lecentrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után 5 percig szobahőmérsékleten szárítottuk a pelleteket, majd nukleáz mentes vízben visszoldottuk és Nanodrop műszerrel mértük az oldat abszorbanciáját. A kísérletek mérése során alkalmazott hullámhossz: excitációs 550 nm és emissziós 570 nm.

5.6.6 Polyplexek celluláris internalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során használt polyplexek fluoreszcensen jelölt siRNS-ből és jelöletlen vagy fluoreszceinnel jelölt ciklodextrin polimerből álltak. Az oldatok koncentrációja 5 µM-os volt. A kísérletek során 80.000 db Caco-2 intesztinális epitél sejtet szélesztettünk egy 24 lyukú lemezben elhelyezett korongokra és 2-3 napig növesztettük a sejteket, amíg elérték a megfelelő konfluenciát (kb. 50-60%). Ezt követően a sejteket egyszer mostuk HBSS-sel, majd 30 percig, 4 vagy 24 órán keresztül 37 °C-on, sötétben inkubáltuk a polimer, siRNS vagy polyplex oldatokban a mostuk sejteket. Ezt követően háromszor HBSS-sel, majd 15 percig szobahőmérsékleten 3,7 %-os formaldehid oldatban fixáltuk a sejteket. A fixálást követően háromszor mostuk HBSS-sel és megfestettük a sejtmagokat DAPI festékkel (283 nM) 10 percig, szobahőmérsékleten fénytől védve. A sejteket egyszer mostuk HBSS-sel, majd a fedőlemezt ragasztottuk a mintákra és másnap konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM880 – Airy-scan konfokális lézer pásztázó mikroszkóp, Jena, Németország) vizsgáltuk. A spektrális átvilágítás kiküszöbölésére a mintákat három különböző gerjesztéssel világítottuk meg "multi-track" módban (UV: 351,1 nm és 363,8 nm vonal Ar-ion lézer; kék: 488 nm Ar-ion lézer; vörös: 633 nm He-Ne lézer). A 420 nm feletti, 505 nm feletti és 650 nm feletti emissziót ezt követően három csatornán detektáltuk.

5.6.7 Polyplexek celluláris internalizációjának vizsgálata áramlási citometriával

Áramlási citometriai méréseinket a konfokális mikroszkópiával végzett kísérleteink megerősítésére végeztük el. A kísérletek során a sejttenyésztő flaskában lévő Caco-2 sejteket 0,05 %-os tripszin-EDTA oldattal feltripszineztük, majd a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel és 1x10⁶ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk. Ezt követően a sejteket 30 percig 37 °C-on inkubáltuk siRNS, polimer vagy polyplex oldatokban. Az oldatok konentrációja minden esetben 5 μM volt. Az inkubációs idő elteltével a sejteket kétszer mostuk hideg HBSS-sel, majd fixáltuk 1%-os paraformaldehid oldatban. A celluláris fluoreszcencia intenzitást Guava Easy Cyte 6HT-2L áramlási citométerrel mértük (Merck Ltd., Darmstadt, Németország). A mérések során a következő gerjesztési hullámhosszt alkalmaztuk: siRNS 695/50 nm.

5.7 Statisztikai analízis

A statisztikai analízis elvégzésére SigmaStat 3.5 és GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk. Az adatokat átlag ± SD-ként adtuk meg. A csoportok összehasonlítását ANOVA használatával, Dunett *post hoc* teszttel végeztük el. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük p<0,05 esetében.

6. Eredmények

6.1 Ciklodextrinek celluláris hatásai

6.1.1 Citotoxicitás

A különböző koncentrációjú hidroxipropil-, és random metilezett béta-ciklodextrin oldatok Caco-2 intesztinális epitél és HeLa méhnyakrák sejtekre gyakorolt citotoxikus hatásait RTCA módszerrel vizsgáltuk. A HPBCD esetében csak az 50 mM-os, még RAMEB esetében már a 10 mM-os koncentráció is toxikus volt mindkét sejtvonalra (7. ábra).



7. *ábra:* Ciklodextrinek citotoxicitása az idő függvényében. A HPBCD (A) és RAMEB (B) citotoxicitása Caco-2 (a) és HeLa (b) sejteken az idő függvényében, RTCA módszerrel mérve.

A későbbi kísérleteink során a sejteket 30 percig inkubáltuk a ciklodextrin oldatokkal, ezért így is ábrázoltuk az RTCA által számolt normalizált sejtindexet 30 percnél. Azt találtuk, hogy 30 perces kezelés során, mind Caco-2 (8.a ábra), mind pedig HeLa sejtvonalon (8.b ábra) csak az 50 mM-os RAMEB mutatott toxikus hatásokat a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest. A későbbi vizsgálataink során, nem toxikus 50 µM-os koncentrációt és 30 perces inkubációs időt alkalmaztunk.



8. ábra: Citotoxitás 30 perces ciklodextrin kezelést követően. A HPBCD (A) és RAMEB (B) citotoxicitása Caco-2 (a) és HeLa (b) sejteken 30 perces kezelést követően, RTCA módszerrel mérve. Átlag ±SD ábrázolunk, n= 3, * p <0.05, *** p <0.001 az ANOVA alapú kontrollhoz képest.</p>

6.1.2 Celluláris internalizáció

A fluoreszceinnel és rhodaminnal jelölt HBPCD celluláris internalizációját és intracelluláris lokalizációját Caco-2 és HeLa sejtvonalon fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (9. ábra). A sejtmembrán mentén és a sejtmag körül is kisebb illetve nagyobb ciklodextrin tartalmú vezikulumokat detektáltunk. A fluoreszcens jelölés nem befolyásolja ezen származékok endocitózisát, mindkét festékkel jelölt molekulatípus bejutott a sejtek citoplazmájába.



9. *ábra:* Ciklodextrinek endocitózisának vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek FITC-HPBCD, Rho-HPBCD kezelt és kezeletlen Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtekről. Mindkét származék bejut a sejtekbe, kisebb vezikulumokban a sejtmambrán mentén, még nagyobb vezikulumokban a sejtmag körül lokalizálósik. (Zöld: FITC-HPBCD, piros: Rho-HPBCD, kék: sejtmag). Az ábrán látható skála 20 µm-es.

Eredményeinket megerősítettük áramlási citometriával. Caco-2 sejtek esetén a méréseket Dr. Nagy Béla és Dr. Fejes Zsolt végezték el. Ehhez néhány mintát előkezeltünk az endocitózis különféle gátlószereivel, majd 50 µM-os FITC-HPBCD vagy FITC-RAMEB oldatokkal kezeltük 0 °C vagy 37 °C-on. A kísérlet végén az elhalt sejteket megfestettük propidium-jodiddal, majd a celluláris fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük. A gátlószerekkel előkezelt minták esetén mért fluoreszcencia intenzitást a kezeletlen minták esetén mért fluoreszcencia intenzitáshoz hasonlítottuk. Caco-2 intesztinális epitél sejtek esetén mind a hűtés, mind pedig a rottlerin, amely a macropinocitózis gátlószere szignifikánsan gátolta a ciklodextrin származékok endocitózisát (10.a. ábra). A többi vizsgált gátlószernek nem volt szignifikáns gátló hatása a származékok celluláris internalizációjára, azonban a klórpromazin-hidroklorid érdekes módon szignifikánsan növelte mind a FITC-HPBCD, mind a FITC-RAMEB felvételét a sejtekbe. HeLa sejtek esetében csak a hűtés gátolta szignifikánsan a ciklodextrinek endocitózisát, míg a többi vizsgált endocitózis gátlószernek nem volt szignifikáns gátló hatása sem FITC-HPBCD, sem pedig FITC-RAMEB esetén. Érdekes módon a rottlerin FITC-RAMEB esetén szignifikánsan növelte a celluláris internalizációt (10.b. ábra).







a)
10. ábra: Ciklodextrinek endocitózisának vizsgálata áramlási citometriával. A különböző gátlószerek és hűtés hatása FITC-HPBCD (A) és FITC-RAMEB (B) endocitózisára Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtek esetén a kezeletlen kontrollhoz képest. A jégen történő hűtés szinte tökéletesen gátolta az endocitózist mindkét sejtvonal esetében, még Caco-2 sejtek esetén a rottlerin szignifikánsan gátolta, a klórpromazin-hidroklorid szignifikánsan növelte a származékok felvételét. HeLa sejtek esetén a rottlerin szignifikánsan növelte a FITC-RAMEB sejtekbe történő felvételét. Az ábrán az adatok átlagát±SD ábrázoltuk, n= 3, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 az ANOVA alapú kontrollhoz képest.

6.1.3 NF-kappaB útvonalra gyakorolt hatás

Ebben a kísérletben a HPBCD és RAMEB hatásait teszteltük az NF-κB gyulladásos útvonalra. A kísérletek során az NF-κB p65-ös alegységének sejtmagba történő transzlokációját vizsgáltuk, mely során anti-p65 antitesttel jelöltük, míg a sejtmagokat DAPI festékkel. Az útvonal lehetséges aktiválódását a különböző ciklodextrin származékok által fluoreszcens mikroszkópiával tettük láthatóvá (11. ábra). A sejteket előkezeltük 50 μ M-os ciklodextrin oldatokkal, majd elsődleges és másodlagos antitest oldatokkal. Ebben az esetben a kezeletlen kontroll mintákhoz képest zöld jelet csak a citoplazmában detektáltunk. A ciklodextrinek nem aktiválták a p65-ös alegység transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba sem Caco-2, sem pedig HeLa sejteken, tehát ezen származékok nem indukálnak gyulladásos folyamatokat a sejtekben. Pozitív kontroll esetében a sejteket előzetesen 50 ng/ml koncentrációjú TNF-α oldattal inkubáltuk, majd az elsődleges és másodlagos antitest oldatokkal. Ez esetben zöld jelet detektáltunk a sejtmagokban is, ami azt jelenti, hogy a TNF-α indukálja a p65-ös alegység transzlokációját, ezáltal gyulladásos folyamatokat.



11. *ábra:* NF-kappa B útvonal vizsgálata ciklodextrin kezelést követően. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtekről az NFκB útvonal vizsgálat után. A HBPCD és RAMEB előkezelés a kontroll mintához képest nem indukálta az NF-κB heterodimer p65-ös alegységének transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba. A pozitív kontroll TNF- α indukálta a transzlokációt. (Zöld: p65 alegység, kék: sejtmag). Az ábrán látható skála 20 μm-es.

6.1.4. Autofágiára gyakorolt hatás

Vizsgáltuk a HPBCD és RAMEB autofágiára gyakorolt hatását. Elsőként kvalitatívan teszteltük fluoreszcens mikroszkópiával, mely során az autofagoszómák membránjában található LC3B molekulát jelöltük anti-LC3B antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festékkel festettük meg (12. ábra). Rho-HPBCD és Rho-RAMEB kezelések után az autofagoszómák jelenléte detektálható volt, hasonlóan a kontroll mintához mind Caco-2, mind pedig HeLa sejteken. Ugyanakkor a pozitív kontrollként alkalmazott chloroquine kezelés esetében intenzívebb autofagoszóma képződést tapasztaltunk mindkét sejtvonal esetén, mint a ciklodextrin kezelések estében. Kísérleteinket azért végeztük rhodaminnal jelölt ciklodextrin származékokkal, hogy meghatározzuk a ciklodextrinek lokalizációját a sejtekben. Néhány intracelluláris vezikulában az LC3B zöld, illetve a rhodaminnal jelölt ciklodextrin piros jelét kolokalizálódva (sárga jel) detektáltuk, ami arra utal, hogy ezen származékok csak kis mennyiségben lokalizálódnak az autofagoszómákban.



12. *ábra:* Autofágia vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek autofagoszómákat tartalmazó Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtekről. Rho-HBPCD és Rho-RAMEB kezeléseket követően az autofagoszómák jelenléte a kontroll mintához hasonló. Chloroquine kezelést követően az autofagoszómák jelölése intenzívebb. Az ábrán látható skála 20 μm-es.

Ezt követően eredményeinket kvantitatív mérésekkel igazoltuk. Az autofagoszómák membránját CYTO-ID® Green Detection Reagent-tel, még a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel festettük meg. A fluoreszcencia intenzitást microplate leolvasóval mértük, az eredményeket normalizáltuk a sejtszámra és relatív fluoreszcencia intenzitásként fejeztük ki (13. ábra). A ciklodextrinekkel való kezelés a kontroll mintához képest nem indukálta szignifikánsan az autofagoszómák képződését, míg a chloroquinnel kezelt minta esetén mért fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll minta esetén (p<0,01).



13. *ábra:* Autofágia kvantitatív vizsgálata. HPBCD, RAMEB és chloroquine kezelés hatása az LC3B expresszióra Caco-2 (a) és HeLa (b) sejteken. A ciklodextrin kezelés nem növelte az autofagoszómák képződését a kontroll mintához képest, még a chloroquine kezelés szignifikánsan növelte az autofagoszóma formációt. Az eredményeket sejtszámra normalizáltuk és relatív fluoreszcencia intenzitásként fejeztük ki. Átlag ±SD ábrázolunk, ** p <0.001, **** p <0.0001 az ANOVA alapú kontrollhoz képest.

6.1.5 A lizoszómák eljutnak a sejtekbe

Vizsgáltuk az Rho-HBPCD és Rho-RAMEB Caco-2 sejtekben, valamint a FITC-HPBCD és FITC-RAMEB HeLa sejtekben található lizoszómákra gyakorolt hatását. Először kvalitatív vizsgálatokat végeztünk fluoreszcens mikroszkópiával. A ciklodextrin kezeléseket követően a lizoszómák jelenléte LysoTracker® festéssel kimutatható volt a sejtekben, hasonlóan a kontroll mintához (14. ábra). A zöld és a piros jel számos intracelluláris vezikulumban kolokalizálódik (sárga jel), ami azt jelenti, hogy ezen ciklodextrin származékok celluláris internalizációját követően szignifikáns mennyiség detektálható a lizoszómákban, mind Caco-2, mind pedig HeLa sejtvonalon.



14. *ábra:* Lizoszómák vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal ciklodextrin kezelést követően. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtekről a lizoszómák LysoTracker[®] festékkel történő jelölése után. A ciklodextrin származékok képesek bejutni a lizoszómákba. A kolokalizáció sárga jelként jelenik meg a felvételeken. Az ábrán látható skála 20 μm-es.

Eredményeinket áramlási citometriával igazoltuk. Jelöletlen HPBCD és RAMEB kezelést követően a LysoTracker lizoszómális festés intenzitása (piros fluoreszcencia) hasonló a csak LysoTrackerrel kezelt mintához, mind Caco-2, mind pedig HeLa sejteken. A FITC-HPBCD és FITC-RAMEB kezeléseket követően csak a zöld fluoreszcencia intenzitása emelkedett meg, piros fluoreszcencia intenzitást nem érzékeltünk. A fluoreszceinnel jelölt ciklodextrin származékokkal és a LysoTracker festékkel kezelt minták esetében a lizoszómális festés piros fluoreszcencia intenzitása nem haladta meg szignifikánsan a csak LysoTrackerrel festett mintákat (15. ábra).



15. *ábra:* Lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával ciklodextrin kezelés után. A Caco-2 (a) és HeLa (b) sejtekben található lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával. Átlag ±SD ábrázolunk. (n=4)

6.2 Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképessége

6.2.1 Az előállított polyplexek tulajdonságai

A polimer oldatok, az siRNS oldat, valamint az siRNS: polimer 1:1 és 1:2 mólarányú polyplexek tulajdonságait DLS (Dinamic Light Scattering) technológiával vizsgáltuk. Malvern Zetasizer Nano műszerrel mértük a méreteloszlást. Ahogy az ábrákon is látható a GAPDH siRNS hidrodinamikai átmérője 336,26 nm (16. ábra). A különböző polimerek méreteloszlása változó: a QABCD polimer hidrodinamikai átmérője 85,96 nm, az NHBCD polimeré 19,586 nm, míg a PEI mérete 4693,8 nm. Az ábrákon az is látható, hogy mindhárom polimer esetében mind az 1:1 mind az 1:2 mólarányú polyplexek mérete a polimer és az siRNS mérete közé esik. Ebből arra következtetünk, hogy a különböző polimerekkel sikeresen képeztünk polyplexeket. Az siRNS méretcsökkenésének az lehet az oka, hogy a pozitív töltésű polimer a negatív töltésű siRNS-sel találkozva kondenzálja azt. A különböző polyplexek hidrodinamikai átmérője az 1. táblázatban látható.



16. *ábra:* Polyplexek méreteloszlása. Az siRNS, a különböző polimerek és a különböző polyplexek méreteloszlása. Q-polimer: QABCDP, NH-polimer: NHBCDP, P-polimer: PEI; 1:1 mólarányú polimer:siRNS poliplex, 2:1 mólarányú polimer:siRNS poliplex

Minta	Hidrodinamikai átmérő	
siRNS	336,26 nm	
QABCDP	85,96 nm	
NHBCDP	19,586 nm	
PEI	4693,8 nm	
Q 1:1	145,82 nm	
Q 2:1	78,712 nm	
NH 1:1	31,906 nm	
NH 2:1	15,430 nm	
P 1:1	1712,60 nm	
P 2:1	7024,40 nm	

1.*táblázat:* Polyplexek átlagos hidridinamikai átmérői. Az siRNS, különböző polimerek és a különböző polyplexek hidrodinamikai átmérője.

A polimerek, az siRNS, valamint a különböző poliplexek zéta- potenciálját Malvern Zetasizer Nano műszerrel High Concentration Zeta Cell-ben változó feszültségű árammal mértük. Ahogy az ábrán is látható az siRNS negatív zéta-potenciállal, míg a polimerek minden esetben pozitív határfelületi potenciállal rendelkeznek (17. ábra). A formulált polyplexek esetében pozitív zéta-potenciál értéket mértünk, amely egyik esetben sem volt magasabb a polimer határfelületi potenciáljától. Ebből arra következtetünk, hogy a komplexálásunk sikeres volt.



17. *ábra:* Ciklodextrin polimerek, siRNS és polyplexek zéta-potenciálja. Q-polimer: QABCDP, NH-polimer: NHBCDP, P-polimer: PEI; 1:1 mólarányú polimer:siRNS poliplex, 2:1 mólarányú polimer:siRNS poliplex

Minta	Zéta- potenciál	
siRNS	-18,96 mV	
QABCDP	+26,53 mV	
NHBCDP	+3,89 mV	
PEI	+3,54 mV	
Q 1:1	+2,99 mV	
Q 2:1	+1,69 mV	
NH 1:1	+3,11 mV	
NH 2:1	+2,72 mV	
P 1:1	+24,73 mV	
P 2:1	+24,1 mV	

 táblázat: Az siRNS, különböző polimerek és a különböző polyplexek zétapotenciálja.

A poliplexek tulajdonságát gélelektorforézissel is vizsgáltuk. A gélelektroforézist Dr. Gyöngyösi Alexandra és Dr. Lekli István végezték el. A méréseket először a 100 nM koncentációjú siRNS-sel végeztük el, mivel az siRNS-t általában 50-100 nM koncentációban alkalmazzák. Ezen eredményeink alapján elmondható, hogy habár a detektált jel intenzitása alacsony volt, az siRNS önmagában elmozdul a frontvonalról. 100 nM koncentrációjú siRNS esetén a 128:1 polimer:siRNS mólarányú poliplexben az siRNS teljes mértékben a polimerhez kötött, a nagyméretű poliplex nem látható a gélen, a poliplex vélhetően a frontvonalon maradt (18. ábra (a)). 500 nM koncentrációjú siRNS esetén már a 64:1 mólarányú poliplex is tökéletesen megköti az siRNS-t (18. ábra (b)), a nagyméretű komplex nem mozdul a frontvonalról.



18.ábra: Gélelektroforézis. (a) 100 nM koncentációjú siRNS, (b) 500 nM koncentációjú siRNS. L: létra, P: polimer

6.2.2 Polimerek és polyplexek sejtproliferációra gyakorolt hatása

Az siRNS és a különböző koncentrációjú polimer oldatok Caco-2 sejtek sejtproliferációjára gyakorolt hatását RTCA módszerrel vizsgáltuk. Az alkalmazott polimerek proliferációra gyakorolt hatását 50 és 100 nM-os koncentrációban vizsgáltuk. Ahogy az ábrán is látható (19. ábra) a polimerek nem befolyásolják az intesztinális epitél sejtek proliferációját, arra nem gyakorolnak negatív hatást. Ezzel szemben a pozitív kontrollként alkalmazott 1% Triton X-100 gátolta a proliferációt.



19. *ábra:* Polimerek citotoxitása az idő függvényében. A különböző polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatása az idő függvényében RTCA módszerrel mérve. A szórást nem ábrázoltuk a jobb áttekinthetőség érdekében. (n=3)

A további kísérleteink során maximum 2 napig kezeltük a sejteket, ezért a 2. napon mért normalizált sejtindex értékeket külön is vizsgáltuk, ábrázoltuk. Ezek alapján elmondható, hogy 2 napos kezelést követően az alkalmazott polimerek nem gyakorolnak szignifikáns hatást a Caco-2 sejtek sejtproliferációjára. A Triton X- 100 minden időpontban szignifikánsan gátolta a sejtproliferációt. (20. ábra)



20. *ábra:* Polimerek citotoxitása 2 nap után. A különböző polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatása Caco-2 sejteken 2 napos kezelést követően, RTCA módszerrel mérve. Az adatokat átlag±SD formájában ábrázoltuk, n= 3, ** p < 0,01, **** p < 0.0001 a kontrollhoz képest. Az összehasonlítást ANOVA teszttel végeztük.

6.2.3 Polyplexek celluláris internalizációja

A különböző polyplexek celluláris internalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópos felvételeket Dr. Vámosi György készítette. Ahogy az ábrán is megfigyelhető, a csak siRNS-sel kezelt minták esetén nem detektáltunk piros jelet a citoplazmában, tehát nem kerül felvételre a fluorofórral jelölt siRNS a sejtekbe. Ugyanez mondható el az NH polimerrel formulált polyplexek esetén is. A Q polimerrel formulált polyplexek esetén piros és zöld jelet is detektáltunk a citoplazmában. Ez alapján elmondható, hogy mind a FITC-konjugált Q polimer, mind az siRNS felvételre kerül a sejtekbe. Sárga jellel kolokalizáció figyelhető meg, amiből

arra következtetünk, hogy a ciklodextrin polimer és az siRNS egy helyen találhatóak meg a citoplazmában. PEI-vel formulált polyplexek esetén piros jelet csak a sejthatárok mentén detektáltunk, amiből arra következtetünk, hogy ezen polyplexek vagy kikötődtek a sejtmembránhoz, vagy a sejtmembránban, nagyobb aggregátumokban, membrán lefűződésekben találhatóak meg (21. és 22. ábra). 4 és 24 órás inkubációt követően a 2:1 mólarányú QABCDP polyplex esetén a zöld és a piros jel kolokalizációban található meg, amiből arra következtetünk, hogy a polyplex hosszú inkubációs időt követően is megtalálható a sejtekben. 32:1 mólarányú polyplex esetén sem 4, sem pedig 24 óra után nem detektáltunk piros jelet, amiből arra következtetünk, hogy ez a polyplex nem kerül felvételre a sejtekbe (23. ábra).



21. ábra: Polyplexek endocitózisának vizsgálata 1. Konfokális mikroszkópos felvételek
Caco-2 sejtekről 1:1 mólarányú polyplexekkel történő 30 perces kezelést követően.
Kék- sejtmag, piros- siRNS, zöld- Q polimer. Az ábrán látható skála 10 µm-es.



22. *ábra:* Polyplexek endocitózisának vizsgálata 2. Konfokális mikroszkópos felvételek Caco-2 sejtekről 2:1 mólarányú polyplexekkel történő 30 perces kezelést követően. Kék- sejtmag, piros- siRNS, zöld- Q polimer. Az ábrán látható skála 10 µm-es.



23. *ábra:* Polyplexek endocitózisának vizsgálata 3. Konfokális mikroszkópos felvételek Caco-2 sejtekről 2:1 és 32:1 mólarányú, 4 és 24 órás polyplexekkel történő kezelést követően. Kék- sejtmag, piros- siRNS, zöld- Q polimer. Az ábrán látható skála 10 µmes.

Eredményeinket megerősítettük áramlási citometriai mérésekkel, mely során az siRNS piros fluoreszcencia intenzitását mértük. A hisztogramokon megfigyelhető, hogy az NH polimerrek formulált polyplexekkel történő kezelést követően a fluoreszcencia intenzitás megegyezik a kontroll mintáéval. Ez azt jelenti, hogy az siRNS- t és a polyplexeket is az inkubálást követő mosással kimostuk a mintákból, nem kerültek felvételre a sejtekbe (24. ábra (b)). A Q polimerrel formulált polyplexek esetén a piros jel erősebb volt, a kontroll mintához képest. Ez azt jelenti, hogy ezeket a polyplexeket az inkubálást követő mosással nem mostuk ki, azok felvételre kerültek a sejtekbe (24. ábra (a)). PEI-vel formulált polyplexekkel kezelt minták esetén élő sejteket nem detektáltunk a mintákban. Ez azért lehet, mert az alkalmazott, 5 µM koncentráció már toxikus volt a sejtek számára.



24. ábra: A különböző polyplexek celluláris internalizációja áramlási citometriával mérve.

7. Megbeszélés

7.1 A ciklodextrinek intracelluláris lokalizációja és a sejtekre kifejtett hatásai

A ciklodextrinek manapság egyre szélesebb körben alkalmazott segédanyagok számos iparágban, valamint egyre több forgalomba kerülő gyógyszerben is megtalálhatóak. Mindemellett a hidroxi-propil-béta-ciklodextrin önállóan alkalmazott gyógyszer a C típusú Niemann- Pick szindróma kezelésében. A széleskörű felhasználás, a biztonságos alkalmazhatóság érdekében fontos ismerni ezen segédanyagok celluláris, valamint a főbb intracelluláris útvonalakra gyakorolt hatását. Kutatómunkánk első részében célul tűztük ki a két leggyakrabban alkalmazott ciklodextrin származék, a hidroxi-propil-béta-, (HPBCD), valamint a random metilezett-béta-ciklodextrin (RAMEB) celluláris internalizációjának és intracelluláris hatásainak vizsgálatát Caco-2 és HeLa sejtvonalon.

Elsőként a fent említett származékok citotoxicitását vizsgáltuk, rövid, 30 perces inkubálást követően. Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta ezen származékok citotoxicitását Caco-2 sejtvonalon MTT módszerrel, mely alapján elmondható, hogy 30 perces inkubációt követően a RAMEB IC50 értéke 30,0±2.78 mM, míg a HPBCD IC50 értéke >200 mM [23]. Kapott eredményeink alapján megállapítható (összhangban korábbi eredményeinkkel), hogy RTCA módszerrel vizsgálva mind Caco-2 bélhám epitél, mind pedig HeLa méhnyakrák epitél sejtek esetében a RAMEB már 10 mM, a HPBCD pedig 50 mM koncentrációban toxikus volt a sejtek számára (7. és 8. ábra). A két módszer esetén kapott eltérő értékek a módszerek különbözőségéből adódnak. Az RTCA módszer a sejtek morfológiai változásait és az elektródokkal való membránkölcsönhatást érzékeli, ami egy korábbi és kisebb koncentrációra is érzékeny esemény az MTT által mért mitokondriális károsodásnál. Az RTCA a sejtek sejttenyésztő lemezre való letapadásának mérésén alapuló mérési módszer. A sejtmorfológiában, a sejtek letapadásában, illetve a sejtek által kialakított elektromos ellenállásban való bármilyen változás sejtindex változást okoz. Az 7. ábrán bemutatott RTCA eredmények alátámasztják ezt az elméletet. HPBCD és RAMEB esetében volt egy nem toxikus 50 µM-os koncentráció, aminek nem volt szignifikáns hatása a sejtekre és sejtindexre. Megfigyelhető egy nem toxikus koncentrációtartomány-HPBCD esetén 500 µM és 10 mM között, RAMEB esetén 500 µM, amelyek szignifikánsan növelték a sejtindexet, illetve egy toxikus, HPBCD és RAMEB esetén is 50 mM koncentráció, ami csökkentette a sejtindexet. A sejteket érő toxikus vagy nem toxikus membránhatás elkerülése érdekében további kísérleteinkben 50 µM ciklodextrin koncentrációt alkalmaztunk.

Ezen eredmények *in vivo* megfeleltetése nehéz, mert a méréseink során alkalmazott környezet nem felel meg sem az enterális, sem pedig a parenterális körülményeknek.

Vizsgálataink során HBSS volt az oldószer, amely az *in vivo* környezettel ellentétben nem tartalmaz semmilyen fehérjét vagy lipidet, melyek befolyásolhatják a mérési eredményeket. Az így kapott citotoxikus koncentráció értékek szérummentes és teljes mediumban is eltérnének az *in vivo* toxikus koncentrációktól.

Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a fluoreszceinnel jelölt RAMEB fluid fázisú endocitózissal felvételre kerül Caco-2 sejtekben [7,94], azonban a különböző fluoreszcens jelöléseket ugyanazon ciklodextrin származékok esetén még nem hasonlították össze. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva kimutattuk, hogy a fluoreszceinnel és rhodaminnal jelölt HPBCD, valamint RAMEB felvételre kerül mind pedig HeLa sejtvonalon. A vizsgált származékok kisebb Caco-2, mind vezikulumokban a sejtmembrán mentén, nagyobb vezikulumokban pedig a sejtmag körül lokalizálódnak (9. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja a ciklodextrin származékok endocitózisának kialakulását, mindkét festékkel jelölt származék esetén megfigyelhető a sejtekbe történő bejutás. Az endocitózis pontos mechanizmusát különböző gátlószerek alkalmazásával áramlási citométerrel vizsgáltuk. Mindkét sejtvonal esetén a vizsgált ciklodextrin származékok-FITC-HBPCD és a FITC-RAMEB- endocitózisa hőmérséklet függő, hiszen a sejtek +4 °C-on való inkubálása szignifikánsan gátolta a ciklodextrinek endocitózisát (10. ábra). Az endocitózis mechanizmusában a két sejtvonalon különbségeket tapasztaltunk. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy Caco-2 bélhám epitél sejteken az endocitózis fő mechanizmusa a makropinocitózis, míg HeLa sejtvonalon feltehetően több egyidejű folyamat játszódik le. A rottlerin szignifikánsan gátolta mindkét származék endocitózisát Caco- 2 sejtvonalon. Érdekes módon tapasztaltuk, hogy a wortmannin és az LY294002, melyek szintén a macropinocitózis gátlószerei nem gyakoroltak hatást a ciklodextrinek celluláris internalizációjára. Ez azzal magyarázható, hogy a fent említett gátlószereknek eltérő a hatásmechanizmusa. A rottlerin egy protein kináz C inhibitor, míg a wortmannin és az LY294002 a foszfatidilinozitol-3-kinázt gátolják [95]. A filipin, amely a caveolamediált endocitózis gátlószere, nem gátolta szignifikánsan a ciklodextrinek endocitózisát. A nocodazole, amely megzavarja a mikrotubulusok polimerizációját nem befolyásolta a celluláris internalizációt. A klórpromazin-hidroklorid, amely egy antipszichotikum, gátolja a klatrin-függő endocitózist [46]. Ezen gátlószer hatása erősen sejttípus függő. Bélhám sejteken ezen gátlószer szignifikánsan növelte mindkét ciklodextrin származék endocitózisát; a FITC- RAMEB internalizációját nagyobb mértékben. Ennek az lehet az oka, hogy a klatrin-függő endocitózis gátlása más útvonalakat serkenthet, vagy pedig ez az amfipatikus molekula növeli a sejtmembrán fluiditását, ezáltal növelve az endocitózist [96]. A klórpromazin által növelt membrán fluiditás összhangban van azzal, hogy a ciklodextrinek képesek kivonni a koleszterint a sejtmembránból. A FITC-RAMEB nagyobb mértékű internalizációjára, az lehet a magyarázat, hogy a RAMEB-nek nagyobb koleszterin szolubilizáló kapacitása van, mint a HPBCD-nek, hozzájárulva a membránfluiditás növeléséhez [23]. HeLa sejteken azt találtuk, hogy a klórpromazin nem befolyásolja a ciklodextrin endocitózis mértékét. Eredményeinkkel ellentétben Plazzo és munkatársai fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva azt találták, hogy a klórpromazin gátolja az endocitózis folyamatát HeLa sejteken, a sejtmembrán közelében tartja a fluoreszcein jelölt metilbéta-ciklodextrin tartalmú vezikulákat [48]. Az eltérő eredményre az lehet a magyarázat, hogy fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva a vezikulák pontos lokalizációját tudták vizsgálni, míg áramlási citométerrel a teljes sejt fluoreszcenciát mérjük. Ezért habár a ciklodextrinek internalizáció után a sejtmembrán közelében maradnak, mi citométerrel azt is mértük, de a vezikulák pontos helyét nem tudtuk meghatározni. HeLa sejtvonalon, érdekes módon a rottlerin szignifikánsan emelte a FITC-RAMEB endocitózisát, a fent említett többi gátlószernek nem volt hatása a ciklodextrin endocitózisára. Kapott eredményeink azt mutatják, hogy a ciklodextrinek celluláris internalizációját tekintve jelentős különbségek vannak a két sejttípus között. Ez a különbség alkalmas lehet sejttípus szelektív celluláris internalizáció által közvetített gyógyszerbejuttatásra, szelektív támadáspontú ciklodextrin alapú gyógyszerfejlesztésekhez. A két származék felvétele közötti különbség az általunk vizsgált két származék biológiai aktivitásával magyarázható: a HPBCD egy hidrofil, még a RAMEB egy lipofil ciklodextrin származék, melynek nagyobb koleszterin szolubilzáló affinitása van.

Az NF-kappa B útvonal egy gyulladásos útvonal a sejtekben, mely során a p65 sejtmagi transzlokációja kulcsfontosságú esemény a gyulladásos alegység reakciókban. Ez a folyamat hozzájárulhat az epiteliális barrierek megnyílásához is a jelátviteli útvonalak szintjén [97,98]. A nanoméretű gyógyszerhordozók fejlesztésénél és tesztelésénél mindig felmerül az immunogenitás és a gyulladásos folyamatok kiváltásának kérdése. Az NF-kappa B útvonal vizsgálatával célunk volt a ciklodextrinekről meglévő tudásunk ilyen irányú bővítése is. Kutatócsoportunk már korábban kidolgozott egy módszert az NF-kappa B útvonal vizsgálatára [99,100]. Ezt során a fent említett p65 jelöltük felhasználva kísérleteink alegységet immunfluoreszcens módszerekkel és nyomon követtük sejtmagi transzlokációját. Azt találtuk, hogy a hidroxi-propil-béta-, valamint a random-metilezett-béta-ciklodextrin 50 µM-os nem toxikus koncentrációban nem aktiválja ezt a gyulladásos útvonalat sem Caco-2, sem pedig HeLa sejtvonalon, valamint a folyamatos celluláris felvétel sem okozza az útvonal aktiválását (11. ábra).

Az autofágia egy önemésztő folyamat, melynek fontos szerepe van a diszfunkcionális és felesleges sejtkomponensek lebontásában és újrahasznosításában. Kameyama és munkatársai azt találták, hogy a folát-kapcsolt metil-béta-ciklodextrin indukálja az autofágia egy speciális fajtáját, a mitofágiát [74]. A mitofágia nem más, mint a kórosan működő mitokondriumok eltávolítása a sejtekből. Ezzel ellentétben mi azt találtuk, hogy habár az autofagoszómák detektálhatóak, megtalálhatóak mind az intesztinális epitél sejtekben, mind pedig a HeLa sejtekben HPBCD és RAMEB kezelést követően is, azonban ezen származékok nem növelik az autofagoszómák mennyiségét a sejtekben a kontroll mintához képest (12. ábra). Mindemellett fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva azt találtuk, hogy a rhodaminnal jelölt HPBCD és RAMEB kis mennyiségben bejut az autofagoszómákba, melyre a ciklodextrin piros és az autofagoszóma zöld jelének kolokalizációjából következtetünk. Mindezen eredményekből arra következtetünk, hogy a HPBCD és RAMEB 50 µM-os, nem toxikus koncentrációban nem okozza a sejtkomponensek olyan károsodásait, amely az autofágiához vezetne.

A lizoszómák olyan sejtkompartmentek, amelyekben a kémhatás savas, mely aciditás szükséges a benne lévő enzimek működéséhez. A lizoszómáknak szintén fontos szerepe van a felesleges, kórosan működő sejtkomponensek lebontásában. Az autofágia utolsó lépéseként a képződött autofagoszóma fúzionál a lizoszómával [101], ahol a bekebelezett komponensek degradálódnak. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált két ciklodextrin származék- a HPBCD és RAMEB- az autofagoszómákba kismértékben, míg lizoszómákba csak а szignifikáns mennyiségben felvételre kerül (14. ábra). A Caco-2 sejtekben nagyobb lizoszómális vezikulákat, magasabb ciklodextrin tartalommal detektáltunk, mint a HeLa sejtekben. Ez a különbség a két sejtvonal között, alkalmas lehet lizoszómális célzott terápiák fejlesztéséhez a rák kezelésében [102], amely pH-reszponzív hatóanyagokat vagy hordozókat alkalmazva a lizoszómákban gazdagabb sejttípusokat hatékonyabban és szelektívebben támadhatja.

	Caco-2 sejtvonal	HeLa sejtvonal	
Ciklodextrinek citotoxicitása	HPBCD esetén az 50 mM-os, RAMEB esetén a 10 mM- os koncentráció a sejtekre nézve toxikus. Szignifikáns sejtindex csökkentő hatása csak az 50 mM-os RAMEB oldatnak van. A későbbi kísérletekhez alkalmazott koncentráció 50 µM. (RTCA módszerrel mérve)		
Fluoreszcens ciklodextrinek celluláris internalizációja	A ciklodextrinek nagyobb vezikulumokban a sejtmag körül, kisebb vezikulumokban a sejtmagtól távolabb, a sejtmembrán közelében lokalizálódnak. (FM)		

A hasonlóságok és a különbségek a két sejtvonal között a 4. táblázatban találhatóak összefoglalva.

	Normalizált fluoreszcencia intenzitás (50 µM, FC) FITC-HPBCD: 35.63 ± 2.72 FITC-RAMEB: 4.96 ± 1.23	Normalizált fluoreszcencia intenzitás (50 μM, FC) FITC-HPBCD: 8.55 ± 2.26 FITC-RAMEB: 2.13 ± 0.33	
	Az alacsony hőmérséklet szignifikánsan gátolja a ciklodextrinek internalizációját. (FC)		
	Rottlerin szignifikánsan csökkenti az endocitózist. (FC)	Rottlerin szignifikánsan növeli az endocitózist FITC-RAMEB esetén. (FC)	
	Klórpromazin szignifikánsan növeli a ciklodextrinek internalizációját. (FC)	A klórpromazinnak szignifikáns hatása nincs. (FC)	
	Az endocitózis fő típusa: folyadékfázisú endocitózis.	Az endocitózis típusa: pontos meghatározása további kísérleteket igényel, fő mechanizmusként folyadékfázisú endocitózis kizárható.	
Lizoszómák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata	Vizsgált ciklodextrinek: Rho-HPBCD, Rho- RAMEB	Vizsgált ciklodextrinek: FITC-HPBCD, FITC- RAMEB	
	A ciklodextrinek bejutnak a lizoszómákba, intenzívebb festődést a kontrollhoz képest nem mutatnak, nem indukálják a lizoszómák képződését. (FM, FC)		
NF-ĸB útvonal vizsgálata	Nincs sejtmagba történő p53 transzlokáció, nem indukálódik az NF-кB gyulladásos útvonal. (FM)		
Autofágia vizsgálata	Kvalitatív és kvantitatív vizsgálatok alapján sem a Rho- HPBCD, sem a Rho-RAMEB nem indukálja az autofagoszómák képződését, az autofágiát. A pozitív kontrollként alkalmazott chloroquine hatása szignifikánsan különbözik a kontroll mintához képest. (FM, MR)		

3.táblázat: Hasonlóságok és különbségek a Caco- 2 és HeLa sejtvonal között. FM: fluoreszcens mikroszkóp, FC: áramlási citométer, MR: microplate reader

7.2 siRNS hordozóképesség vizsgálat eredményeinek megbeszélése

Manapság az RNS alapú technológiáknak, így az siRNS alapú készítményeknek is egyre nagyobb szerepe van különböző betegségek kezelésében, illetve a diagnosztikában. Kutatómunkám második részében célul tűztük ki két ciklodextrin polimer, valamint a polietilén- imin siRNS hordozóképességének vizsgálatát. Ennek a kutatásnak abban van nagy jelentősége, hogy az siRNS- t nehéz bejuttatni a sejtekbe, valamint az intracelluláris szállítása is kihívás elé állítja a kutatókat [80]. Kísérleteink során modellként a GAPDH siRNS-t használtunk, mert ehhez könnyen hozzá lehet jutni, illetve a GAPDH a sejtekben, egy nagymértékben expresszálódó háztartási fehérje, így a későbbi vizsgálataink során a hatás vizsgálata is könnyen kivitelezhető.

Elsőként különböző mólarányú polyplexeket formuláltunk GAPDH siRNS- sel. 1:1 és 2:1 mólarányú komplexeket formuláltunk melyeknek DLS technológiával vizsgáltuk a méreteloszlását és zéta-potenciálját. Kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a polyplex formulálás sikeres volt, hiszen az siRNS mérete csökkent (16. ábra), negatív zéta-potenciálja eltűnt (17. ábra). Di Silvio és munkatársai poli-allil-aminnal (PAH) formulált polyplexek esetén azt találták, hogy a nitrogén/foszfát arány befolyásolja az siRNS tökéletes komplexálását [103]. A formulált polyplexek tulajdonságát gélelektroforézisel vizsgálva koncentráció függést tapasztaltunk. 100 nM koncentrációjú siRNS esetán a 128:1 mólarányú, míg 500 nM koncentrációjú siRNS esetén már a 64:1 mólarányú QABCDP polyplex is a frontvonalon maradt, azaz a polimer teljes mértékben megkötötte az siRNS-t (18. Ennek oka lehet a poliplex majdnem semleges töltése és a méretének ábra). megváltozása. A DLS-sel mért méret egy hidrodinamikai átmérő, amely a molekulák körül elhelyezkedő hidrátburkot is magában foglalja. A poliplex kialakulásakor az siRNS mérete csökkenni látszik, azonban ez a hidrátburka elvesztésével is magyarázható. A poliplex mérete feltehetően nagyobb, mint az siRNS mérete hidrátburok nélkül és ez a gélben a mobilitását is csökkenti.

Ezt követően vizsgáltuk az alkalmazott polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatását. Eredményeink alapján elmondható, hogy az alkalmazott koncentrációkban 50 és 100 nM sem a polimerek, sem az siRNS, nem gyakorolnak negatív hatását a sejtproliferációra. A további kísérleteink során legfeljebb 2 napig inkubáltuk a sejteket a polyplexekkel, így vizsgáltuk a polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatását ezen időpontokban is. Ez alapján elmondható, hogy a polimerek 2 napot követően sem gyakorolnak negatív hatást a Caco- 2 sejtek proliferációjára (19. és 20. ábra).

Kutatócsoportunk már korábban vizsgálta, hogy a különböző ciklodextrin származékok felvételre kerülnek-e a sejtekbe. Ahogy fent említettem az siRNS transzfektálása kihívás a kutatók számára. Fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk, hogy a formulált polyplexek felvételre kerülnek a Caco-2 sejtekbe. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a három vizsgált polimer között szignifikáns eltéréseket találtunk (21., 22., 23. ábra). A QABCD polimerrel formulált polyplexek bejutnak a sejtekbe, a citoplazmában kisebb, nagyobb vezikulumokban lokalizálódnak. Elmondható az is, hogy rövid, 30 perces és hosszú távú, 4 és 24 órás inkubálást követően az siRNS és a polimer egy helyen található meg a citoplazmában [103]. NH polimerrel formulált polyplexek nem kerülnek felvételre a sejtekbe. A két ciklodextrin polimerrel formulált polyplexek közti eltérés adódhat a polimerek tulajdonságaiból. A QABCD egy kvaterner-amino, míg az NH egy mono- amino módosított polimer. Α polietiléniminnel formulált polyplexek pedig feltételezhetően kikötődnek a sejtmembránhoz, kisebb, nagyobb membránlefűződésekben találhatóek meg. Eredményeinket megerősítettük áramlási citometriával és kvantitatív mérésekkel is, mely alapján szintén elmondható, hogy csak a QABCD polimerrel formulált polyplexek kerülnek felvételre a sejtekbe.

8. Összefoglalás

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok a lipofil hatóanyagok biohasznosíthatóságának növelésében, valamint már önálló gyógyszerként is alkalmazzák a hidroxi-propil-béta-ciklodextrint a C típusú Niemann-Pick betegség kezelésére. Azonban az alkalmazott származékok biztonságos alkalmazhatósága elsőként vizsgáltuk а ciklodextrinek intracelluláris érdekében hatásáit. Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a származékok endocitózissal felvételre kerülnek a sejtekbe, azonban a különböző fluoreszcens jelöléseket ugyanazon származék esetén nem hasonlították össze. Eredményeink alapján elmondható, hogy a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja a HPBCD és RAMEB celluláris internalizációját. Endocitózis után kisebb vezikulumokban a sejtmembrán mentén, nagyobb vezikulumokban pedig a sejtmag körül lokalizálódnak, mindkét sejtvonalon. Caco-2 sejtek esetében az endocitózis fő mechanizmusa а makropinocitózis, míg HeLa sejtek esetében feltételezhetően több egyidejű folyamat. Ezen származékok nem okozzák a p65 alegység transzlokációját a sejtmagba, tehát nem indukálják az NF-kappa B gyulladásos útvonalat. A kontroll mintához képest nem fokozzák az autofagoszómák képződését, azonban megtalálhatóak az autofagoszómákban. A HPBCD és a RAMEB sem indukálja a lizoszómák képződését, azonban felvételre kerülnek a lizoszómákba. Caco-2 sejtekben nagyobb méretű és nagyobb ciklodextrin tartalmú lizoszómák figyelhetőek meg, mint HeLa sejtek esetében.

Az utóbbi években az siRNS alapú terápiák nagy fejlődésen mentek keresztül, számos hordozórendszer található meg a piacon vagy áll fejlesztés alatt, azonban az siRNS transzfektálása a sejtekbe oly módon, hogy terápiában is alkalmazhatóvá váljon, kihívást jelent. A ciklodextrin polimereket már régóta alkalmazzák az ilyen hordozórendszerek kialakítására. Kutatómunkánk során célunk volt két kationos ciklodextrin polimer, valamint a polietilén-imin siRNS hordózóképességének összehasonlítása. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindhárom polimer képes kötni az siRNS-t. Komplexálást követően megváltozott az siRNS mérte és határfelületi potenciálja. Az általunk vizsgált polimerek nem gyakorolnak negatív hatást a Caco-2 intesztinális epitél sejtek proliferációjára. A különböző polyplexek eltérő celluláris internalizációt mutatnak. A QABCDP polyplexek felvételre kerülnek a sejtekbe, ahol a citoplazmában kisebb- nagyobb vezikulumokban lokalizálódnak. Az NHBCDP polyplexek nem kerülnek felvételre, míg a PEI polyplexek a sejtmembrán mentén, sejtmembrán lefűződésekben találhatóak meg. További terveink között szerepel a formulált polyplexek GAPDH és Pgp fehérje expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata.

9. Conclusion

Cyclodextrins are widely used excipients to increase the bioavailability of lipophilic drugs. In addition, hydroxypropyl beta-cyclodextrin has been recognized as an orphan drug for the treatment of type C Niemann-Pick disease. However, the intracellular effects of cyclodextrins were investigated for the first time in this study to elaborate the safety of these derivatives. Our research group has previously shown that cyclodextrin derivatives are taken up by cells by endocytosis, however, the different fluorescent labeleling were not compared on the same derivative. Based on our results, it can be said that fluorescent labeling does not influence the cellular internalization of HPBCD and RAMEB. After endocytosis, they are localized in smaller vesicles along the cell membrane and in larger vesicles around the nucleus, on both cell lines. In the case of Caco-2 cells, the more precise mechanism of endocytosis is macropinocytosis, while even in the case of HeLa cells it is presumably the result of several simultaneous processes. These derivatives do not cause the translocation of the p65 subunit into the nucleus, and therefor they do not promote the NF-kappa B inflammatory pathway. Compared to the control sample, they do not induce the formation of autophagosomes and are found in small amounts in these vesicles. Neither HPBCD nor RAMEB induces lysosome formation, although, they are detectable in the lysosomes. Lysosomes with larger size and higher cyclodextrin content were observed in Caco-2 cells compared to HeLa cells.

In recent years, siRNA-based therapies have undergone great development, a number of carrier systems are on the market or under development is increasing, although, transfecting siRNA into cells is still challenging. Cyclodextrin polymers have been used to form such carrier systems. Our aim was to compare the siRNA carrying capacity of two cationic cyclodextrin polymers and polyethyleneimine (PEI). Based on our results, all three polymers are able to bind siRNA. Following complexation, the size and zeta potential of siRNA were changed. The polymers we tested did not have a negative effect on the proliferation of Caco-2 intestinal epithelial cells. Different polyplexes show different cellular internalization pathways. QABCDP polyplexes are taken up by cells, where they are localized in smaller and larger vesicles in the cytoplasm. NHBCDP polyplexes are not taken up, while even PEI polyplexes are found along the cell membrane in cell membrane ligaments. Our further plans include to study the effects of formulated polyplexes on GAPDH and Pgp protein expression.

10. Irodalomjegyzék

10.1 Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

- 1. Braga, S.S. Cyclodextrins: Emerging medicines of the new millennium. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9120801.
- 2. Crini, G.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Morin-Crini, N. Cyclodextrins, from molecules to applications. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16*, 1361–1375, doi:10.1007/s10311-018-0763-2.
- 3. Szászné Réti-Nagy, K., Fenyvesi, F. Ciklodextrinek alkalmazása II. *Gyogyszereszet* **2014**, *58*.
- 4. Szente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137–142, doi:10.1016/j.tifs.2003.09.019.
- 5. Rosenbaum, A.I.; Zhang, G.; Warren, J.D.; Maxfield, F.R. Endocytosis of betacyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, doi:10.1073/pnas.0914309107.
- Loftsson, T.; Vogensen, S.B.; Brewster, M.E.; Konráðsdóttir, F. Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery Through Biological Membranes. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96, 2532–2546, doi:10.1002/jps.20992.
- Fenyvesi, F.; Réti-Nagy, K.; Bacsó, Z.; Gutay-Tóth, Z.; Malanga, M.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Váradi, J.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; et al. Fluorescently labeled methyl-beta-cyclodextrin enters intestinal epithelial Caco-2 cells by fluid-phase endocytosis. *PLoS One* 2014, 9, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0084856.
- Crini, G. The contribution of Franz Schardinger to cyclodextrins: a tribute on the occasion of the centenary of his death. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2020, 97, 19–28, doi:10.1007/s10847-020-00990-3.
- Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* 2004, 76, 1825–1845, doi:10.1351/pac200476101825.
- 10. Szejtli, J. Ciklodextrinek és zárványkomplexeik a biotechnológiában és a vegyiparban. *Magy. Kémikusok Lapja* **1990**, *45*, 98–106.
- Rekharsky, M. V.; Mayhew, M.P.; Goldberg, R.N.; Ross, P.D.; Yamashoji, Y.; Inoue, Y. Thermodynamic and Nuclear Magnetic Resonance Study of the Reactions of *α*- and β-Cyclodextrin with Acids, Aliphatic Amines, and Cyclic Alcohols. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *101*, 87–100, doi:10.1021/jp962715n.
- 12. Hattori, K.; Ikeda, H. Modification Reactions of Cyclodextrins and the Chemistry of Modified Cyclodextrins. In *Cyclodextrins and Their Complexes*;

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2006; pp. 31–64 ISBN 3527312803.

- 13. Krause, R.W.; Mamba, B.B.; Bambo, F.M.; Malefetse, T.J. Cyclodextrin polymers: Synthesis and application in water treatment. *Cyclodextrins Chem. Phys.* **2010**, 168–194.
- Haimhoffer, Á.; Rusznyák, Á.; Réti-Nagy, K.; Vasvári, G.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F. Cyclodextrins in drug delivery systems and their effects on biological barriers. *Sci. Pharm.* 2019, 87, doi:10.3390/scipharm87040033.
- Gidwani, B.; Vyas, A. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin-β-cyclodextrin polymer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014, 114, 130–137, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.035.
- 16. Morin-Crini, N.; Crini, G. Environmental applications of water-insoluble βcyclodextrin- epichlorohydrin polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 344–368, doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.06.005.
- Moulahcene, L.; Skiba, M.; Senhadji, O.; Milon, N.; Benamor, M.; Lahiani-Skiba, M. Inclusion and removal of pharmaceutical residues from aqueous solution using water-insoluble cyclodextrin polymers. *Chem. Eng. Res. Des.* 2015, *97*, 145–158, doi:10.1016/j.cherd.2014.08.023.
- Fauvelle, F.; Debouzy, J.C.; Crouzy, S.; Göschl, M.; Chapron, Y. Mechanism of α-cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction of phosphatidylinositol from the membrane. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 935–943, doi:10.1021/js9602453.
- Debouzy, J.C.; Fauvelle, F.; Crouzy, S.; Girault, L.; Chapron, Y.; Göschl, M.; Gadelle, A. Mechanism of α-cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and cholinephospholipids. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 59–66, doi:10.1021/js970180j.
- 20. Kilsdonk, E.P.C.; Yancey, P.G.; Stoudt, G.W.; Bangerter, F.W.; Johnson, W.J.; Phillips, M.C.; Rothblat, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* **1995**, doi:10.1074/jbc.270.29.17250.
- 21. Monnaert, V.; Tilloy, S.; Bricout H.; Cecchelli, R.; Monflier, E. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and Their Derivatives on an in Vitro Model of Blood-Brain Barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 745–751, doi:10.1124/jpet.104.067512.
- Ohtani, Y.; Irie, T.; Uekama, K.; Fukunaga, K.; Pitha, J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 1989, 186, 17–22.

- Kiss, T.; Fenyvesi, F.; Bácskay, I.; Váradi, J.; Fenyvesi, É.; Iványi, R.; Szente, L.; Tósaki, Á.; Vecsernyés, M. Evaluation of the cytotoxicity of β-cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 376–380, doi:10.1016/j.ejps.2010.04.014.
- 24. Castagne, D.; Fillet, M.; Delattre, L.; Evrard, B.; Nusgens, B.; Piel, G. Study of the cholesterol extraction capacity of β-cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, *63*, 225–231, doi:10.1007/s10847-008-9510-9.
- Róka, E.; Ujhelyi, Z.; Deli, M.; Bocsik, A.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Fenyvesi, F.; Vecsernyés, M.; Váradi, J.; Fehér, P.; et al. Evaluation of the Cytotoxicity of α-Cyclodextrin Derivatives on the Caco-2 Cell Line and Human Erythrocytes. *Molecules* 2015, 20, 20269–20285, doi:10.3390/molecules201119694.
- 26. LAMBERT, D.; O'NEILL, C.A.; PADFIELD, P.J. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem. J.* **2005**, doi:10.1042/bj20041377.
- 27. Chan, L.M.S.; Lowes, S.; Hirst, B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 25–51, doi:10.1016/j.ejps.2003.07.003.
- Gutay-Tóth, Z.; Fenyvesi, F.; Bársony, O.; Szente, L.; Goda, K.; Szabó, G.; Bacsó, Z. Cholesterol-dependent conformational changes of P-glycoprotein are detected by the 15D3 monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 2016, 1861, 188–195, doi:10.1016/j.bbalip.2015.12.007.
- 29. Fenyvesi, F.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Goda, K.; Bacsó, Z.; Bácskay, I.; Váradi, J.; Kiss, T.; Molnár, É.; Janáky, T.; et al. P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 236–242, doi:10.1016/j.ejps.2008.04.005.
- Walkley, S.U.; Suzuki, K. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 2004, 1685, 48–62, doi:10.1016/j.bbalip.2004.08.011.
- 31. Xu, Y.; Zhang, Q.; Tan, L.; Xie, X.; Zhao, Y. The characteristics and biological significance of NPC2: Mutation and disease. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2019**, 782, doi:10.1016/j.mrrev.2019.108284.
- 32. Mt, V.; Niemann, M.G. Niemann Pick disease type C. 2003, 269–281.
- Ory, D.S.; Ottinger, E.A.; Farhat, N.Y.; King, K.A.; Jiang, X.; Weissfeld, L.; Berry-Kravis, E.; Davidson, C.D.; Bianconi, S.; Keener, L.A.; et al. Intrathecal 2hydroxypropyl-β-cyclodextrin decreases neurological disease progression in

Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial. *Lancet* **2017**, *390*, 1758–1768, doi:10.1016/S0140-6736(17)31465-4.

- Berry-Kravis, E.; Chin, J.; Hoffmann, A.; Winston, A.; Stoner, R.; LaGorio, L.; Friedmann, K.; Hernandez, M.; Ory, D.S.; Porter, F.D.; et al. Long-Term Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease With Intrathecal 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin. *Pediatr. Neurol.* 2018, *80*, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.12.014.
- 35. Vecsernyés, M.; Fenyvesi, F.; Bácskay, I.; Deli, M.A.; Szente, L.; Fenyvesi, É. Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. *Arch. Med. Res.* **2014**, *45*, 711–729, doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.020.
- 36. Wang, M.S.; Boddapati, S.; Sierks, M.R. Cyclodextrins promote protein aggregation posing risks for therapeutic applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 526–531, doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.077.
- 37. Deli, M.A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 892–910, doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.09.016.
- 38. Bacso, Z.; Nagy, H.; Goda, K.; Bene, L.; Fenyvesi, F.; Matkó, J.; Szabó, G. Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytom. Part A* **2004**, *61*, 105–116, doi:10.1002/cyto.a.20081.
- 39. Garrigues, A.; Escargueil, A.E.; Orlowski, S. The multidrug transporter, Pglycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 10347–52, doi:10.1073/pnas.162366399.
- 40. Doherty, G.J.; McMahon, H.T. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857–902, doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- 41. Huotari, J.; Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3481–3500, doi:10.1038/emboj.2011.286.
- 42. Conner, S.D.; Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, 422, 37–44, doi:10.1038/nature01451.
- 43. Aderem, A.; Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593–623, doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593.
- 44. Khalil, I.A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* 2006, *58*, 32–45, doi:10.1124/pr.58.1.8.
- 45. Kaksonen, M.; Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 313–326, doi:10.1038/nrm.2017.132.
- 46. Wang, L.H.; Rothberg, K.G.; Anderson, R.G.W. Mis-assembly of clathrin

lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1107–1117, doi:10.1083/jcb.123.5.1107.

- 47. Rusznyák, Á.; Malanga, M.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Váradi, J.; Bácskay, I.; Vecsernyés, M.; Vasvári, G.; Haimhoffer, Á.; Fehér, P.; et al. Investigation of the Cellular Effects of Beta- Cyclodextrin Derivatives on Caco-2 Intestinal Epithelial Cells. *Pharmaceutics* 2021, *13*, 157, doi:10.3390/pharmaceutics13020157.
- 48. Plazzo, A.P.; Höfer, C.T.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Schiller, J.; Herrmann, A.; Müller, P. Uptake of a fluorescent methyl-β-cyclodextrin via clathrin-dependent endocytosis. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 505–511, doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.03.007.
- 49. King, J.S.; Kay, R.R. The origins and evolution of macropinocytosis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2019**, *374*, doi:10.1098/rstb.2018.0158.
- 50. Falcone, S.; Cocucci, E.; Podini, P.; Kirchhausen, T.; Clementi, E.; Meldolesi, J. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 4758–4769, doi:10.1242/jcs.03238.
- Sarkar, K.; Kruhlak, M.J.; Erlandsen, S.L.; Shaw, S. Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 2005, 116, 513–524, doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02253.x.
- 52. Razani, B.; Woodman, S.E.; Lisanti, M.P. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 431–467, doi:10.1124/pr.54.3.431.
- 53. Kiss, A.L. Caveolae and the regulation of endocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, 729, 14–28, doi:10.1007/978-1-4614-1222-9_2.
- Buratta, S.; Tancini, B.; Sagini, K.; Delo, F.; Chiaradia, E.; Urbanelli, L.; Emiliani, C. Lysosomal Exocytosis, Exosome Release and Secretory Autophagy: The Autophagic- and Endo-Lysosomal Systems Go Extracellular. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 1–20, doi:10.3390/ijms21072576.
- Buratta, S.; Tancini, B.; Sagini, K.; Delo, F.; Chiaradia, E.; Urbanelli, L.; Emiliani, C. Lysosomal Exocytosis, Exosome Release and Secretory Autophagy: The Autophagic- and Endo-Lysosomal Systems Go Extracellular. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 1–20, doi:10.3390/ijms21072576.
- 56. Motoyama, K.; Arima, H.; Nishimoto, Y.; Miyake, K.; Hirayama, F.; Uekama, K. Involvement of CD14 in the inhibitory effects of dimethyl-*α*- cyclodextrin on lipopolysaccharide signaling in macrophages. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1707–1714, doi:10.1016/j.febslet.2005.01.076.
- 57. Ueberla, K.; Lu, Y.; Chung, E.; Haseltine, W.A. The NF-kappa B p65 promoter. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1993**, *6*, 227–30.

- 58. Vallabhapurapu, S.; Karin, M. Regulation and function of NF-кВ transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 693–733, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- 59. Mitchell, S.; Vargas, J.; Hoffmann, A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2016**, *8*, 227–241, doi:10.1002/wsbm.1331.
- 60. Schütze, S.; Wiegmann, K.; Machleidt, T.; Krönke, M. TNF-Induced Activation of NF-κB. *Immunobiology* **1995**, *193*, 193–203, doi:10.1016/S0171-2985(11)80543-7.
- 61. O'Dea, E.L.; Kearns, J.D.; Hoffmann, A. UV as an Amplifier Rather Than Inducer of NF-κB Activity. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 632–641, doi:10.1016/j.molcel.2008.03.017.
- 62. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, 1–10, doi:10.1101/cshperspect.a001651.
- Banach-Orłowska, M.; Wyszyńska, R.; Pyrzyńska, B.; Maksymowicz, M.; Gołąb, J.; Miączyńska, M. Cholesterol restricts lymphotoxin β receptortriggered NF-κB signaling. *Cell Commun. Signal.* 2019, *17*, 1–19, doi:10.1186/s12964-019-0460-1.
- 64. Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. The Journal of Pathology, 221, 3–12. http://doi.org/10.1002/path.2697. *J. Pathol.* **2010**, *221*, 3–12, doi:10.1002/path.2697.Autophagy.
- 65. Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 1535–1541, doi:10.1038/sj.cdd.4401728.
- 66. Noda, T.; Ohsumi, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3963–3966, doi:10.1074/jbc.273.7.3963.
- 67. Axe, E.L.; Walker, S.A.; Manifava, M.; Chandra, P.; Roderick, H.L.; Habermann, A.; Griffiths, G.; Ktistakis, N.T. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 685–701, doi:10.1083/jcb.200803137.
- 68. Schaaf, M.B.E.; Keulers, T.G.; Vooijs, M.A.; Rouschop, K.M.A. LC3/GABARAP family proteins: Autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* **2016**, *30*, 3961–3978, doi:10.1096/fj.201600698R.
- 69. Eskelinen, E.L. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* **2008**, *4*, 257–260, doi:10.4161/auto.5179.
- 70. Li, W.; He, P.; Huang, Y.; Li, Y.F.; Lu, J.; Li, M.; Kurihara, H.; Luo, Z.; Meng, T.;

Onishi, M.; et al. Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances. *Theranostics* **2020**, *11*, 222–256, doi:10.7150/THNO.49860.

- 71. Gatica, D.; Lahiri, V.; Klionsky, D.J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 233–242, doi:10.1038/s41556-018-0037-z.
- 72. Yamaguchi, O. Autophagy in the Heart. *Circ. J.* **2019**, *83*, 697–704, doi:10.1253/circj.CJ-18-1065.
- 73. Kaushik, S.; Cuervo, A.M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 365–381, doi:10.1038/s41580-018-0001-6.
- 74. Kameyama, K.; Motoyama, K.; Tanaka, N.; Yamashita, Y.; Higashi, T.; Arima, H. Induction of mitophagy-mediated antitumor activity with folate-appended methyl-β-cyclodextrin. *Int. J. Nanomedicine* 2017, *12*, 3433–3446, doi:10.2147/IJN.S133482.
- 75. Sun, H.; Zong, H.; Wu, G. 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin blocks autophagy flux and triggers caspase-8-mediated apoptotic cascades in HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 1901–1909, doi:10.3892/mmr.2020.11282.
- Kovacs, T.; Sohajda, T.; Szente, L.; Nagy, P.; Panyi, G.; Varga, Z.; Zakany, F. Cyclodextrins Exert a Ligand-like Current Inhibitory Effect on the KV1.3 Ion Channel Independent of Membrane Cholesterol Extraction. *Front. Mol. Biosci.* 2021, *8*, 1–11, doi:10.3389/fmolb.2021.735357.
- 77. Dai, S.; Dulcey, A.E.; Hu, X.; Wassif, C.A.; Porter, F.D.; Austin, C.P.; Ory, D.S.; Marugan, J.; Zheng, W. Methyl-β-cyclodextrin restores impaired autophagy flux in Niemann-Pick C1-deficient cells through activation of AMPK. *Autophagy* 2017, *13*, 1435–1451, doi:10.1080/15548627.2017.1329081.
- 78. Ren, B.; Jiang, B.; Hu, R.; Zhang, M.; Chen, H.; Ma, J.; Sun, Y.; Jia, L.; Zheng, J. HP-β-cyclodextrin as an inhibitor of amyloid-β aggregation and toxicity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 20476–20485, doi:10.1039/c6cp03582e.
- 79. Han, H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1706*, 293–302, doi:10.1007/978-1-4939-7471-9_16.
- 80. Kanasty, R.; Dorkin, J.R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 967–977, doi:10.1038/nmat3765.
- 81. Whitehead, K.A.; Langer, R.; Anderson, D.G. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129–138, doi:10.1038/nrd2742.
- 82. Ming, X. Cellular delivery of siRNA and antisense oligonucleotides via receptor-mediated endocytosis. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 435–449,

doi:10.1517/17425247.2011.561313.

- 83. Schroeder, A.; Levins, C.G.; Cortez, C.; Langer, R.; Anderson, D.G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J. Intern. Med.* **2010**, *267*, 9–21, doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02189.x.
- 84. Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H. The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 892–899, doi:10.1248/bpb.b13-00059.
- 85. Dong, Y.; Siegwart, D.J.; Anderson, D.G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *144*, 133–147, doi:10.1016/j.addr.2019.05.004.
- Agrawal, N.; Dasaradhi, P.V.N.; Mohmmed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R.K.; Mukherjee, S.K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67, 657–685, doi:10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003.
- 87. Downward, J. Science, medicine, and the future: RNA interference. *Br. Med. J.* **2004**, *328*, 1245–1248.
- 88. Gonzalez, H.; Hwang, S.J.; Davis, M.E. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 1068–1074, doi:10.1021/bc990072j.
- 89. Chaturvedi, K.; Ganguly, K.; Kulkarni, A.R.; Kulkarni, V.H.; Nadagouda, M.N.; Rudzinski, W.E.; Aminabhavi, T.M. Cyclodextrin-based siRNA delivery nanocarriers: A state-of-the-art review. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 1455– 1468, doi:10.1517/17425247.2011.610790.
- 90. Heidel, J.D. Cyclodextrin-containing polycations for nucleic acid delivery. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, *6*, 1319–1322, doi:10.1101/pdb.top066639.
- 91. Liu, J.; Ding, X.; Fu, Y.; Xiang, C.; Yuan, Y.; Zhang, Y.; Yu, P. Cyclodextrins based delivery systems for macro biomolecules. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *212*, 113105, doi:10.1016/j.ejmech.2020.113105.
- O'Mahony, A.M.; Godinho, B.M.D.C.; Ogier, J.; Devocelle, M.; Darcy, R.; Cryan, J.F.; O'Driscoll, C.M. Click-Modified Cyclodextrins as Nonviral Vectors for Neuronal siRNA Delivery. *ACS Chem. Neurosci.* 2012, *3*, 744–752, doi:10.1021/cn3000372.
- 93. Lee, S.D.; Osei-Twum, J.A.; Wasan, K.M. Dose-dependent targeted suppression of P-glycoprotein expression and function in Caco-2 cells. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2323–2330, doi:10.1021/mp300668e.
- 94. Réti-Nagy, K.; Malanga, M.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Vámosi, G.; Váradi, J.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Róka, E.; et al. Endocytosis of fluorescent

cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 509–517, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.049.

- 95. DAVIES, S.P.; REDDY, H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95, doi:10.1042/0264-6021:3510095.
- 96. Ivanov, A.I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol.* **2008**, 440, 15–33, doi:10.1007/978-1-59745-178-9_2.
- 97. Van De Walle, J.; Hendrickx, A.; Romier, B.; Larondelle, Y.; Schneider, Y.J. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol. Vitr.* **2010**, *24*, 1441– 1449, doi:10.1016/j.tiv.2010.04.002.
- Choi, H.J.; Kim, J.; Park, S.H.; Do, K.H.; Yang, H.; Moon, Y. Pro-inflammatory NF-κB and early growth response gene 1 regulate epithelial barrier disruption by food additive carrageenan in human intestinal epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 2012, 211, 289–295, doi:10.1016/j.toxlet.2012.04.012.
- 99. Váradi, J.; Harazin, A.; Fenyvesi, F.; Réti-Nagy, K.; Gogolák, P.; Vámosi, G.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Vasvári, G.; et al. Alpha-melanocyte stimulating hormone protects against cytokine-induced barrier damage in caco-2 intestinal epithelial monolayers. *PLoS One* 2017, *12*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0170537.
- 100. Nguyen, T.L.P.; Fenyvesi, F.; Remenyik, J.; Homoki, J.R.; Gogolák, P.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Vasvári, G.; Vecsernyés, M.; et al. Protective effect of pure sour cherry anthocyanin extract on cytokine-induced inflammatory caco-2 monolayers. *Nutrients* 2018, 10, doi:10.3390/nu10070861.
- 101. Lamming, D.W.; Bar-Peled, L. Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic* **2019**, *20*, 27–38, doi:10.1111/tra.12617.
- 102. Piao, S.; Amaravadi, R.K. Targeting the lysosome in cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2016**, *1371*, 45–54, doi:10.1111/nyas.12953.
- 103. Di Silvio, D.; Martínez-Moro, M.; Salvador, C.; de los Angeles Ramirez, M.; Caceres-Velez, P.R.; Ortore, M.G.; Dupin, D.; Andreozzi, P.; Moya, S.E. Selfassembly of poly(allylamine)/siRNA nanoparticles, their intracellular fate and siRNA delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 2019, 557, 757–766, doi:10.1016/j.jcis.2019.09.082.
10.2 A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár ellenőrzött jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/110/2022.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rusznyák Ágnes Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Rusznyák, Á., Palicskó, M., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Váradi, J., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Réti-Nagy, K., Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Fenyvesi, F.: Cellular Effects of Cyclodextrins: studies on HeLa Cells. *Molecules.* 27 (5), 1589, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/molecules27051589 IF: 4.411 (2020)

 Rusznyák, Á., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Váradi, J., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Nagy, B. J., Fejes, Z., Fenyvesi, F.: Investigation of the Cellular Effects of Beta- Cyclodextrin Derivatives on Caco-2 Intestinal Epithelial Cells. *Pharmaceutics.* 13 (2), 1-14, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13020157

IF: 6.321 (2020)

További közlemények

 3. Le Khanh, H. P., Nemes, D., Rusznyák, Á., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivates.
 Polymers. 14, 1-15, 2022.
 IF: 4.329 (2020)

4. Szilágyi, B., Fejes, Z., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., Pócsi, M., Halmi, S., Griger, Z., Kunapult, S., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1. Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions. *Front. Physiol.* 12, 1-14, 2021.
DOI: http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2021.658524
IF: 4.566 (2020)



CENI

5. Haimhoffer, Á., Dossi, E., Béres, M., Bácskay, I., Váradi, J., Afsar, A., Rusznyák, Á., Vasvári, G., Fenyvesi, F.: Preformulation Studies and Bioavailability Enhancement of Curcumin with a 'Two in One' PEG-[beta]-Cyclodextrin Polymer. *Pharmaceutics.* 13 (10), 1-18, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13101710 IF: 6.321 (2020)

 Fejes, Z., Pócsi, M., Takai, J., Erdei, J. Z., Tóth, A., Balogh, E., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., Nagy, A., Kappelmayer, J., Jeney, V., Nagy, B. J.: Preterm Intraventricular Hemorrhage-Induced Inflammatory Response in Human Choroid Plexus Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (16), 1-20, 2021. IF: 5.923 (2020)

 Haimhoffer, Á., Vasvári, G., Trencsényi, G., Béres, M., Budai, I., Czomba, Z., Rusznyák, Á., Váradi, J., Bácskay, I., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Process Optimization for the Continuous Production of a Gastroretentive Dosage Form Based on Melt Foaming. AAPS PharmSciTech. 22 (5), 1-9, 2021.

DOI: http://dx.doi.org/10.1208/s12249-021-02066-y IF: 3.246 (2020)

 Fenyvesi, F., Nguyen, T. L. P., Haimhoffer, Á., Rusznyák, Á., Vasvári, G., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Ignat, S. R., Dinescu, S., Costache, M., Ciceu, A., Hermenean, A., Váradi, J.: Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin. *Materials.* 13 (16), 3618-3629, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ma13163618 IF: 3.623

Szilágyi, B., Fejes, Z., Póliska, S., Pócsi, M., Czimmerer, Z., Patsalos, A., Fenyvesi, F., Rusznyák,
 Á., Nagy, G., Kerekes, G., Berhés, M., Szűcs, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B.
 J.: Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated
 Level of Platelet Activation Status in Sepsis.
 Int. J. Mol. Sci. 21 (3), 1-22, 2020.

DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030866 IF: 5.923

 Haimhoffer, Á., Rusznyák, Á., Réti-Nagy, K., Vasvári, G., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F.: Cyclodextrins in Drug Delivery Systems and Their Effects on Biological Barriers. *Sci Pharm.* 87 (4), 33-53, 2019.

DOI: http://dx.doi.org/10.3390/scipharm87040033



11. Váradi, J., Hermenean, A., Gesztelyi, R., Jeney, V., Balogh, E., Majoros, L., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Árvai, I., **Rusznyák, Á.**, Balta, C., Herman, H., Fenyvesi, F.: Pharmacokinetic Properties of Fluorescently Labelled Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *Biomolecules.* 9 (10), 1-13, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/biom9100509 IF: 4.082

 Hajdu, I., Angyal, J., Szikra, D. P., Kertész, I., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Váradi, J., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., **Rusznyák, Á.**, Trencsényi, G., Fenyvesi, F.: Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of 68Ga-labeled NODAGAhydroxypropyl-beta-cyclodextrin (68Ga-NODAGA-HPBCD). *Eur. J. Pharm. Sci.* 128, 202-208, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.12.001 IF: 3.616

 Vasvári, G., Kalmár, J., Veres, P., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Haimhoffer, Á., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., Váradi, J.: Matrix systems for oral drug delivery: formulations and drug release.

Drug Discov. Today Technol. 548, 1-10, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.009

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 52,361 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,732

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.03.08.



11. Ábrajegyzék

- 1. ábra: A ciklodextrinek szerkezete.
- 2. ábra: Az endocitózis típusainak sematikus ábrája.
- 3. ábra: A különböző endocitotikus útvonalon felvett anyagok intracelluláris sorsa.
- 4. ábra: Az NF- κB útvonal sematikus ábrája.

5. ábra: Az autofágia folyamatának sematikus ábrája.

6. ábra: Az RNS interferencia sematikus ábrája.

- 7. ábra: Ciklodextrinek citotoxicitás az idő függvényében.
- 8. ábra: Citotoxicitás 30 perces ciklodextrin kezelést követően.

9. ábra: Ciklodextrinek endocitózis vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal.

10. ábra: Ciklodextrinek endocitózisának vizsgálata áramlási citometriával.

11. ábra: NF-kappa B útvonal vizsgálata ciklodextrin kezelést követően.

12. ábra: Autofágia vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal.

13. ábra: Autofágia kvantitatív vizsgálata.

14. ábra: Lizoszómák vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal ciklodextrin kezelést követően.

15. ábra: Lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával ciklodextrin kezelés után.

16. ábra: Polyplexek méreteloszlása.

17. ábra: Ciklodextrin polimerek, siRNS és polyplexek zéta-potenciálja.

18. ábra: Gélelektroforézis.

19.ábra: Polimerek citotoxicitása az idő függvényében.

20. ábra: Polimerek citotoxitása 2 nap után.

21. ábra: Polyplexek endocitózisának vizsgálata 1.

22. ábra: Polyplexek endocitózisának vizsgálata 2.

23. ábra: Polyplexek endocitózisának vizsgálata 3.

24. ábra: A különböző polyplexek celluláris internalizációja áramlási citometriával mérve.

12. Táblázatjegyzék

1. táblázat: Polyplexek átlagos hidridinamikai átmérői.

2. táblázat: Az siRNS, különböző polimerek és a különböző polyplexek zétapotenciálja.

3. táblázat: Hasonlóságok és különbségek a Caco- 2 és HeLa sejtvonal között.

13. Tárgyszavak

Caco-2, HeLa, endocitózis, autofágia, NF- κB, lizoszóma, siRNS, Pgp, géncsendesítés

14. Keywords

Caco-2, HeLa, endocytosis, autophagy, NF- κB, lysosome, siRNA, Pgp, gene silecing

15. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet mondok Dr. Fenyvesi Ferenc témavezetőmnek, hogy 2016-ban még TDK hallgatóként lehetőséget adott a Gyógyszertechnológiai tanszéken kísérleti munka végzésére és azóta is folyamatosan segített és támogatott. Köszönöm, hogy lehetővé tette a munkám megírását, témavezetése alatt bármikor számíthattam tanácsaira, ötleteire és szaktudására.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Bácskay Ildikónak és Prof. Dr. Vecsernyés Miklósnak, hogy lehetőséget biztosítottak a Gyógyszertechnológiai Tanszéken kísérleti tudományos munka végzésére.

Köszönettel tartozok a Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársainak Dr. Váradi Juditnak, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fehér Pálmának, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Arany Petrának, Dr. Pető Ágotának, Dr. Kósa Dórának, Dr. Haimhoffer Ádámnak, Dr. Józsa Lizának, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriának, Szilágyi Erikának, Gulyás Évának, Nagyné Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának, Sipos Szilviának, Nagy Tündének, Bátoriné Pataki Brigittának, amiért munkájukkal és szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönettel tartozom továbbá a Gyógyszerhatástan Tanszék munkatársainak, Dr. Lekli Istvánnak ás Dr. Gyöngyösi Alexandrának, akik támogatásukkal és szakmai tudásukkal segítették munkámat.

Köszönetet mondok Dr. Nagy Bélának és Dr. Fejes Zsoltnak, az áramlási citometriai mrérésekben, Dr. Vámosi Györgynek a konfokális mikroszkópiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért, valamint szakmai tanácsaikért.

Végül, de nem utolsó sorban, óriási hálával tartozok Családomnak, akik kitartóan támogatnak és segítenek egész életemben.